

Düşük Rezolüsyonlu NMR Relaksometre ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) Teknikleri Kullanarak D-Psikoz (Nadir Şeker) içeren Glike Protein ve Şekerleme Ürünleri Tasarımı ve Bu Ürünlerin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu

Program Kodu: 2515

Proje No: 116O759

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Mecit H. ÖZTOP

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Gülüm Şümnü
Dr. Öğretim Üyesi. Bekir Gökçen Mazi
Dr. Ulviye Betül Söyler

Danışman(lar):

Bursiyer(ler):

Ozan Taş
Ülkü Ertuğrul
Pelin Poçan
Esmanur İlhan

ÖNSÖZ

1160759 no'lu projenin amacı, proje önerisinde açıklandığı üzere, nadir şeker olarak bilinen D-Psikoza kullanarak düşük kalorili şekerleme ürünleri geliştirmek ve bu ürünlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonlarını yapmak olarak tanımlanır. Projenin alt amaçları ise;

- Soya proteininin D-Psikoza glikasyonunu gerçekleştirip proteinin özelliklerinin nasıl değiştiğini incelemek;
- Glike olmuş ve tabi soya proteini ile nişasta/pektin içeren jel tipli şekerlendirmeler yapıp bu ürünlerin fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özelliklerini incelemek, depolama çalışmalarını yapmak;
- Şekerleme ürünleri tasarımında ve glike olmuş proteinlerin özelliklerinin incelenmesinde NMR Relaksometre ve Manyetik Rezonans Görüntüleme tekniklerini bir kalite belirleme metodu olarak kullanıp European Network on NMR Relaxometry başlıklı COST aksiyonun amaçları ile örtüşecek şekilde bu tekniklerin gıda kalitesi alanındaki farkındalığını arttırmak olarak tanımlanabilir.

Belirtilen proje 2505 COST Programı kapsamında 'European Network on NMR Relaxometry COST Aksiyonu' kapsamında desteklenmiş bir proje olup, Projenin başlangıç tarihinden şu ana kadar, bütün iş paketleri tamamlanmıştır. Daha önce belirtildiği üzere, 1 yayın 'Manyetik Rezonans' alanında oldukça iyi bir dergide basılmıştır. Bunun yanı sıra proje sonuçlarından hazırlanan bir diğer yayın (nişastalı şekerlemeler üzerine hazırlanan); 'polimer, gıda kimyası alanında) oldukça iyi bir dergiye gönderilmiş, yayının ilk yorumları gelmiştir ve revizyon istenmiştir. Karamelizasyon ve glikasyon üzerine hazırlananlar yayınlar yıl sonundan önce etki değeri yüksek dergilere yollanacaktır. Ayrıca Aksiyon kapsamında verilen STSM desteği ile proje önerisinde olmayan ancak elde edilen sonuçları destekleyecek bir deney olan FFC-Relaksometre tekniği ile Polonya'daki Warmia-Mazury Üniversitesinde ek çalışmalar yapılmıştır. Bu deneylerin sonuçları da oradaki grup tarafından analiz edilmektedir. Bizim laboratuvarımızda alınan NMR deneyleri sonuçları ve o sonuçlar birleştirilerek hazırlanacak diğer bir yayın da hazırlık aşamasındadır.

Daha önce belirtildiği üzere, proje çıktılarının paylaşılması için planlanan çalıştay, Haziran ayının ikinci haftası içinde yapılmış ve endüstriden ve akademiden davetlilerin bulunduğu toplam 25 kişi ile proje çıktıları paylaşılmıştır.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1 Soya Proteinin Nadir Şekerler Kullanarak Glikasyonu Ve Glike Edilen Proteinlerin Fiziksel Ve Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	10
3.1.1 Fiziksel Analizler.....	10
3.1.1.1. NMR Relaksometre ile Glike olmuş Proteinlerin incelenmesi	10
3.1.1.2. Emülsifikasyon Aktivitesi Deneyi	10
3.1.1.3. Glike olmuş Protein Çözeltilerinin Vizkozite Ölçümü.....	11
3.1.2 Kimyasal Analizler	12
3.1.2.1. Glike olmuş Protein Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi: CUPRAC Metodu	12
3.1.2.2. Glike olmuş Proteinlerin Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi: DPPH Metodu	12
3.1.2.3. Glike olmuş Proteinlerin Serbest Amino gruplarının : OPA Metodu	13
3.1.2.4. Lowry Yöntemi ile Çözünürlük Tayini	13
3.1.2.5. İndirgen Şeker Miktarı Tayini.....	14
3.1.2.6. Glikasyon Derecesinin Tespiti	14
3.1.3.7. Glikasyon ürünlerinin Tespiti: furozin, karboksimetillisin (CML), karboksietillisin (CEL) analizleri	14
3.1.3.8. Jel Elektroforez Deneyleri	14
3.1.3.8.1 Proteinlerin İzlenmesi	14
3.1.3.8.2 Jel Filtrasyon Kromatografisi (FPLC)	15
3.2. Soya Proteini Veya Glike Olmuş Soya Proteini, D-Psikoz, Nişasta Veya Pektin İçeren Yumuşak Şekerlemelerin Tasarlanması, Karakterizasyonu, Depolama Çalışmalarının Yapılması.....	16
3.2.1. Jelatin içeren şekerlemelerin hazırlanması	16
3.2.2 Nişasta ve Soya Proteini içeren şekerlemelerin hazırlanması	17
3.2.3 Pektin ve Soya Proteini içeren şekerlemelerin hazırlanması	18

3.2.4. Kimyasal Analizler	19
3.2.4.1. Pektin içeren Formülasyonların Sindirim Davranışının incelenmesi.....	19
3.2.5. Fiziksel Analizler.....	20
3.2.5.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) Deneyleri.....	20
3.2.5.2. NMR Relaksometre Deneyleri.....	20
3.2.5.3. X-Ray Difraksiyon Deneyleri (XRD).....	20
3.2.5.4. Tekstür Profil Analizi Deneyleri (TPA)	21
3.2.5.5. Su aktivitesi (aw).....	21
3.2.5.6. Nem İçeriği (%)	21
3.2.5.7. Renk Ölçümü	21
3.2.6. Duyusal Analiz.....	21
3.2.7. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1.Soya Proteinin Nadir Şekerler Kullanarak Glikasyonu ve Glike Edilen Proteinlerin Fiziksel Ve Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	23
4.1.1. Fiziksel Analizler.....	23
4.1.1.1 NMR Relaksometre ile Glike olmuş Proteinlerin İncelenmesi	23
4.1.1.2. Emülsifikasyon Aktivitesi Deneyi	25
4.1.1.3. Glike Olmuş Protein Çözeltilerinin Vizkozite Ölçümü.....	27
4.1.2. Kimyasal Analizler	30
4.1.2.1. Glike olmuş Proteinlerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi :CUPRAC Metodu	30
4.1.2.2. Glike olmuş proteinlerin antioksidan aktivitelerinin Belirlenmesi: DPPH Metodu	33
4.1.2.3. Glike olmuş Proteinlerin Serbest Amino gruplarının: OPA Metodu	36
4.1.2.4. Lowry Yöntemi ile Çözünürlük Tayini	39
4.1.2.5. İndirgen Şeker Miktarı Tayini.....	41
4.1.2.6. Glikasyon Derecesinin Tespiti	43
4.1.2.7 Glikasyon ürünlerinin Tespiti: furozin, karboksimetillisin (CML), karboksietillisin (CEL) analizleri	46
4.1.2.8 Jel Elektrophorez Deneyleri	49
4.1.2.8.1 Proteinlerin İzlenmesi	49
4.1.2.8.2 Jel Filtrasyon Kromatografisi (FPLC)	50
4.2. Soya Proteinini Veya Glike Olmuş Soya Proteinini, D-Psikoz, Nişasta Veya Pektin İçeren Yumuşak Şekerlemelerin Tasarlanması, Karakterizasyonu, Depolama Çalışmalarının Yapılması.....	52
4.2.1. Fiziksel Analizler.....	52

4.2.1.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) Deneyleri	52
4.2.1.2. NMR Relaksometre Deneyleri	55
4.2.1.3. X-ray Difraksiyon Deneyleri (XRD)	70
4.2.1.4. Tekstür Profil Analizi Deneyleri (TPA)	75
4.2.1.5. Su aktivitesi (aw)	78
4.2.1.6. Nem İçeriği (%)	80
4.2.1.7. Renk Ölçümü	82
4.2.1.8. Taramalı Elektron Mikroskopisi	84
4.2.2. Duyusal Analizler	87
5. SONUÇ	91
KAYNAKÇA	93

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Dekstroz şekerinin farklı formülasyonlarının emülsifikasyon değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)25
- Şekil 2. Fruktöz şekerinin farklı formülasyonlarının emülsifikasyon değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)26
- Şekil 3. D-Psikoz şekerinin farklı formülasyonlarının emülsifikasyon değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)27
- Şekil 4. Soya Protein-şeker ve kontrol solüsyonlarının pH 7 de viskozite değerleri ■ Protein-Dekstroz, ■ Kontrol Protein-Dekstroz, ▣ Protein-Fruktöz, ▤ Kontrol Protein-Fruktöz, ▥ Protein- Psikoz, ▦ Kontrol Protein-D-Psikoz28
- Şekil 5. Soya Protein-şeker ve kontrol solüsyonlarının pH 10 da viskozite değerleri ■ Protein-Dekstroz, ■ Kontrol Protein-Dekstroz, ▣ Protein-Fruktöz, ▤ Kontrol Protein-Fruktöz, ▥ Protein- Psikoz, ▦ Kontrol Protein-D-Psikoz28
- Şekil 6. Soya Protein-şeker solüsyonlarının pH 7 ve pH 10'daki viskozite değerleri ■ pH 7 Protein-Dekstroz, ■ pH 10 Protein-Dekstroz, ▣ pH 7 Protein-Fruktöz, ▤ pH 10 Protein-Fruktöz, ▥ pH 7 Protein- Psikoz, ▦ pH 10 Protein-D-Psikoz29
- Şekil 7. Soya Protein-şeker kontrol solüsyonlarının pH 7 ve pH 10'daki viskozite değerleri ■ pH 7 Protein-Dekstroz, ■ pH 10 Protein-Dekstroz, ▣ pH 7 Protein-Fruktöz, ▤ pH 10 Protein-Fruktöz, ▥ pH 7 Protein-Psikoz, ▦ pH 10 Protein-D-Psikoz30
- Şekil 8. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)31
- Şekil 9. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)32
- Şekil 10. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)32

Şekil 11. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)34

Şekil 12. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)34

Şekil 13. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri : ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK(Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)35

Şekil 14. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin serbest amino grup miktarları (g SAG (Serbest Amino Grubu) / g KKM (Kuru Katı Miktarı) : ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK(Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣pH 7/DK(Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)37

Şekil 15. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin serbest amino grup miktarları (g SAG (Serbest Amino Grubu) / g KKM (Kuru Katı Miktarı): ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ■ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▣ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)38

Şekil 16. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin serbest amino grup miktarları (g SAG (Serbest Amino Grubu) / g KKM (Kuru Katı Miktarı): pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş)), ▣ pH 7/DK(Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK(Dondurularak kurutulmuş)38

Şekil 17. Dekstroz şekerinin farklı formülasyonlarının Lowry yöntemi ile çözünürlük tayini: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK(Dondurularak kurutulmuş), ▣pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)39

Şekil 18. Fruktoz şekerinin farklı formülasyonlarının Lowry yöntemi ile çözünürlük tayini: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK(Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)40

Şekil 19. D-Psikoz şekerinin farklı formülasyonlarının Lowry yöntemi ile çözünürlük tayini: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)40

Şekil 20. Dekstroz şekerinin farklı formülasyonlarının glikasyon derecesinin absorbans değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ■ pH 10 / DK (Dondurularak

kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)	44
Şekil 21. Fruktoz şekerinin farklı formülasyonlarının glikasyon derecesinin absorbands değerleri: ▣ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)	45
Şekil 22. D-Psikoz şekerinin farklı formülasyonlarının glikasyon derecesinin absorbands değerleri: ▣ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▣ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)	45
Şekil 23. Farklı protein: şeker (1:1, 3:1, 10:1) oranları ve farklı şeker türlerinden (fruktoz, psikoz, dekstroz) hazırlanan model sistemlerde furozin oluşumu	47
Şekil 24. Farklı protein:şeker (1:1, 3:1, 10:1) oranları ve farklı şeker türlerinden (fruktoz, psikoz, dekstroz) hazırlanan model sistemlerde karboksimetilis (CML) oluşumu.....	48
Şekil 25. Farklı protein:şeker (1:1, 3:1, 10:1) oranları ve farklı şeker türlerinden (fruktoz, psikoz, dekstroz) hazırlanan model sistemlerde karboksietilis (CML) oluşumu.....	48
Şekil 26. Proteinlerin SDS PAGE ile analizi. %12'lik ayırıcı jelde yürümüş olan proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G250 kullanılarak boyanmış UV ışık altında jel görüntüsü.....	50
Şekil 27. Soya proteini (doğal ve glike) için FPLC analizi (0-325 ml elüsyon hacmi) GP (—): Glike soya proteini (dekstroz şekeri ile), SP (—): Doğal soya proteini.....	51
Şekil 28. Soya proteini (doğal ve glike) için FPLC analizi (35-85 ml elüsyon hacmi) Seri 1(—) : Glike soya proteini (dekstroz şekeri ile), Seri 2 (—): Doğal soya proteini	52
Şekil 29. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin camsılığa geçiş sıcaklıkları (Tg) : ▣ 0. Gün , ▤ 28. Gün.....	52
Şekil 30. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin T1 relaksasyon zamanı değerleri: ▣ 0. Gün, ▤ 7. Gün, ▣ 14. Gün, ▤ 21. Gün.....	55
Şekil 31. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin T2 relaksasyon zamanı değerleri: ▣ 0. Gün, ▤ 7. Gün, ▣ 14. Gün, ▤ 21. Gün.....	55
Şekil 32. Jelatin içeren yumuşak şekerlemelerinin depolamanın (a) ilk günü için örnek T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları : P0 (—) and P40 (—) (b) 28. günü için örnek T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları : P0 (—) and P40 (—)	59
Şekil 33. Nişasta ve izole soya proteini içeren yumuşak şekerlemelerinin D-psikoz yer değiştirmesi ile değişen T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları: (a) 11_S0_R30 (—) and 11_S0_R0 (—) (b) 9_S2_R30 (—) and 9_S2_R0 (—)	63

Şekil 34. Aynı miktarda D-psikoz kullanılarak hazırlanmış formülasyonlar için izole soya proteini eklenmesi ile değişen T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları: (a) 9_S2_R0 (—) and 11_S0_R0 (—) (b) 9_S2_R30 (—) and 11_S0_R30 (—).....	63
Şekil 35. Nişasta içeren yumuşak şekerlemelerin 28. gün sonunda D-psikoz yer değiştirmesi ile değişen T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları: (a) 11_S0_R30 (—) and 11_S0_R0 (—) (b) 9_S2_R30 (—) and 9_S2_R0 (—).....	63
Şekil 36. %0 ve %40 D-Psikoz içeren jelatinli şekerlemelerin 0. Gün X-ray sonuçları: P0 (—) ve P40 (—)	70
Şekil 37. %0 ve %40 D-Psikoz içeren jelatinli şekerlemelerin 28. Gün X-ray sonuçları: P0 (—) ve P40 (—)	70
Şekil 38. %11 nişasta ve farklı şeker türleri ile hazırlanmış formülasyonların XRD spektrası 11_S0_R30(—) ve 11_S0_R0 (—) (a) 0.gün (b) 28. gün	71
Şekil 39. %9 nişasta -%2 soy proteini ve farklı şeker türleri ile hazırlanmış formülasyonların XRD spektrası 9_S2_R30(—) ve 9_S2_R0 (—) (a) 0.gün (b) 28. gün	72
Şekil 40. Pektin bazlı yumuşak şekerlerin ilk güne ait X-Ray kırınım modeli S1_SA_035 (—) S0_SA_035(—), S1_SA_350 (—), S0_SA_350 (—)	73
Şekil 41. Pektin bazlı yumuşak şekerlerin 28. güne ait X-Ray kırınım modeli S1_SA_035 (—) S0_SA_035(—), S1_SA_350 (—), S0_SA_350 (—)	74
Şekil 42. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin sertlik değerleri: ■ 0. Gün, ■ 14. Gün, ■ 21. Gün	75
Şekil 43. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin su aktivitesi değerleri: ■ 0. Gün, ■ 7. Gün, ■ 14. Gün, ■ 21. Gün	78
Şekil 44: Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin nem (%) değerleri: ■ 0. Gün, ■ 7. Gün, ■ 14. Gün, ■ 21. Gün	80
Şekil 45. nişasta içeren formülasyonların TEM görüntüleri (A) 11_S0_R0 (B) 11_S0_R30 (C) 9_S2_R0 (D) 9_S2_R30.....	85
Şekil 46. Soya proteini içermeyen şekerlemelerin taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri (a)SA_0/35 (b)SA_10/25 (c)35/0 (d)-(f)sırasıyla sindirim sonrası SEM görüntüleri	86
Şekil 47. %1 Soya proteini içeren şekerlemelerin taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri (a)SA_0/35 (b)SA_10/25 (c)35/0 (d)-(f)sırasıyla sindirim sonrası SEM görüntüleri	87

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Jelatin ile Hazırlanan Şekerleme ürünlerinin Kompozisyonları	17
Tablo 2. Nişasta ve İzole Soya Proteini ile Hazırlanan Şekerleme Ürünlerinin Kompozisyonları.....	17
Tablo 3. Hazırlanan şeker örneklerinin kompozisyonları.....	19
Tablo 4. Farklı şekerinin farklı formülasyonlarının T2 sonuçları: (pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)).....	24
Tablo 5. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin indirgen şeker miktarları (g/L) *pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)	42
Tablo 6. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin indirgen şeker miktarları (g/L) *pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)	43
Tablo 7. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin indirgen şeker miktarları (g/L) *pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)	43
Tablo 8. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin camsılığa geçiş sıcaklıkları	53
Tablo 9. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin T1 relaksasyon zamanı değerleri	56
Tablo 10. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin T2 relaksasyon zamanı değerleri	56
Tablo 11. Farklı formülasyona sahip pektin içeren şekerlemelerin T2 relaksasyon zamanı değerleri	57
Tablo 12. Jelatin bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her alanın T2 (spin-spin) relaksasyon sonuçları	59
Tablo 13. Jelatin bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her pik için görelî alan sonuçları	60
Tablo 14a. Nişasta bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her alanın T2 (spin-spin) relaksasyon sonuçları.....	64
Tablo 15. Pektin bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her pik için görelî alan sonuçları ve her alanın T2 (spin-spin) relaksasyon sonuçları	68

Tablo 16. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin sertlik değerleri	75
Tablo 17. Pektin jellerinin sindirim öncesi ve sonrası sertlik (N) değerleri	77
Tablo 18. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin su aktivitesi değerleri	79
Tablo 19. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin nem içeriği değerleri	80
Tablo 20. Pektin jellerinin sindirim öncesi ve sonrası nem miktarı	82
Tablo 21. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin parlaklık (L), sarılık (b) ve kırmızılık (a) değerleri.....	82
Tablo 22. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin parlaklık (L), sarılık (b) ve kırmızılık (a) değerleri.....	83
Tablo 23. CIE Lab renk sistemi sabitleri	84
Tablo 24. Duyusal analiz sırasında kullanılan ürün kod bilgileri	88
Tablo 25. Nişasta ve sükroz içeren formülasyon duyusal analiz sonucu	88
Tablo 26. Nişasta ve D-psikoz içeren formülasyon duyusal analiz sonucu	89
Tablo 27. Nişasta –İzole soya proteini ve sükroz içeren formülasyon duyusal analizi	89
Tablo 28. Nişasta –İzole soya proteini ve D-psikoz içeren formülasyon duyusal analizi	89
Tablo 29. Pektin-İzole Soya Proteini ve D-psikoz içeren formülasyon duyusal analizi	89
Tablo 30. Pektin ve D-psikoz içeren formülasyon duyusal analizi	90
Tablo 31. Pektin-İzole Soya Proteini ve sükroz içeren formülasyon duyusal analizi.....	90
Tablo 32. Pektin ve sükroz içeren formülasyon duyusal analizi	90

ÖZET

Nadir şeker, doğada yaygın olarak bulunmayan monosakkaritleri kapsayan şeker grubuna verilen genel addır. Meyve şekeri fruktozun C-3 epimeri olan ve nadir bir şeker olan D-Psikozun (alluloz) tatlılığı sakarozun %70'ine denk gelmektedir. Kalori değeri ise 0.39 kCal/g olan D-Psikozun, vücutta yağ toplanmasını ve kandaki glikoz seviyesini azaltmada etkisi olduğu ve ısıtma işlemi sonucunda oluşturduğu bileşenlerin antioksidatif etki gösterdiği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. A.B.D Gıda ve İlaç Komisyonu, 2012 yılında D-Psikozu GRAS (Güvenli olarak kabul edilebilir) statüsüne aldıktan sonra bu şekerin sakaroz yerine kullanımının önü açılmış olmuştur. D-Psikozun emilim metabolizması, sağlık üzerindeki etkileri ve gıdalarda kullanımı ile ilgili araştırmalar Kagawa Üniversitesinde hala devam etmektedir. D-Psikozun gıdalarda kullanımı ile ilgili Türkiye'de henüz herhangi bir araştırma yapılmadığı bilinmektedir. European Network on NMR Relaxometry COST aksiyonu çağrısı altında önerilen bu projede, D-Psikoz ile formüle edilen farklı şekerleme ürünlerinin tasarlanması ve bu ürünlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Bahsi geçen COST Aksiyonu NMR Relaksometre'nin gıda kalitesi araştırmalarında kullanımını da kapsamaktadır. Proje kapsamında D-Psikoz kullanarak 2 farklı ürün tasarlanacak ve bu ürünlerin farklı özellikleri incelenecektir. Proje kapsamında, soya proteini ve nişasta/pektin içeren jel yapıda yumuşak şekerlemeler ve D-Psikozla glike olmuş soya proteini üretilenektir. Piyasada var olan şekerleme ürünlerinin çoğunun jelatin tabanlı olduğu düşünüldüğünde soya proteini ile yapılacak bir şekerlemenin sektöre katma değeri olabileceği açıktır. Özellikle jelatinli ürün tüketmeyi tercih etmeyen kesim düşünüldüğünde (vejetaryenler, veganlar) bu ürün şekerleme sektörü için bir yenilik sayılabilecektir. Soya proteini, nişasta ve pektin içeren şekerleme ürünlerine dair çalışmalar literatürde mevcuttur. Proje kapsamında geliştirilecek ürünün, D-Psikoz içerecek olması, şekerlemelerin hem D-Psikozla glike olmuş hem de olmamış soya proteini ile hazırlanacak olması projenin yenilikçi yönünü artırmakla beraber projeye özgünlük kazandırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nadir Şeker, D-Psikoz, Şekerleme, , Glikasyon, Soya Proteini, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) , NMR Relaksometre

ABSTRACT

Rare sugar is a generic name of a sugar group consisting of monosaccharides that is not widely found in nature. The sweetness of rare sugar D-Psicose, which is the C-3 epimer of fruit sugar fructose, is equivalent to the 70% of the sweetness of sucrose. Through the carried out researches, it was revealed that; D-Psicose, which has a calorific value of 0.39 kCal/g, had an effect on reduction of blood glucose level and body fat accumulation and also products formed when D-Psicose was heated in the presence of proteins were found to show significant antioxidative effect. In 2012, it was announced that D-Psicose would be classified as GRAS (Generally Recognized as Safe) by U.S. Food and Drug Administration (FDA), which paved the way for D-Psicose as an alternative to sucrose. There has not been any research conducted on the use of D-Psicose in Turkey to date. This project, presented under the COST Action of 'European Network on NMR Relaxometry, aims to carry out research, on the design of different confectionary products formulized with D-Psicose and on the characterization of the physical, chemical and health effects of these products. In the scope of this project, 2 different products will be designed by using D-Psicose and different properties of these products will be examined. Soy protein that is glycated with D-Psicose and a soft-gel structured confectionary product containing soy protein, starch/pectin and D-Psicose will be formulated. Considering that most of the confectionary products in the market are gelatin based, it is clear that a confectionary product made with soy protein will possibly provide added value to the industry. Especially, in consideration of some segments of the population that prefer not to consume gelatin-containing products, this product has a definite target group. There are studies on confectionary products containing soy protein, starch and pectin in the literature but no studies on the use of D-Psicose in soy based confectionery products have been reported.

Keywords: Rare Sugar, D-Psicose, confectionery, glycation, soy protein, Magnetic Resonance Imaging (MRI) , NMR Relaxometry

1. GİRİŞ

Hazır, hızlı gıda tüketiminin, atıştırılabilir olarak nitelendirilen ürün çeşitliliğinin, şekerleme ürünlerinin tüketiminin artması obezitenin yaygınlaşması ile yakından ilişkilendirilmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre Türkiye'de 2012 yılında, 15 ve daha yukarı yaştaki nüfusun %17,2'sinin obez olduğu gözlenmiştir. Yerleşim yeri ve cinsiyete göre obezite oranları incelendiğinde, kentsel yerleşim yerlerindeki kadınlarda obezite oranı %20,8 iken erkeklerde bu oranın %13,3 olduğu belirtilmiştir (www.tuik.gov.tr, 2014). Diğer taraftan, sağlıklı yaşam bilinci de özellikle kentsel yerleşimde artmış, organik, katkısız, proteince zengin gıdalara yönelim artmıştır. Az yağlı, şekerli, lif içeriği yüksek gıdaların üretimi birçok gıda firmasının Ar-Ge çalışmalarında önemli bir yere gelmiştir. Özellikle az şekerli ürünlerde şeker ikamesi olarak, aspartam, asesülfam K ve sükraloz yaygın olarak kullanılan tatlandırıcılar olmuştur. Sükralozun tatlılık derecesinin diğer tatlandırıcılara göre çok yüksek olması, fırınlanmış ürünlerde kullanılabilir olması bu tatlandırıcının pazarını büyötmüştür. Ancak, sükralozun kimyasal bir tatlandırıcı olması (sakarozun 3 OH grubunun klorlanması sonucunda elde edilir (Chattopadhyay ve ark., 2011) tüketiciler tarafından kabulünü kısıtlamaktadır. Sükraloza alternatif olarak Stevia rebaudiana bitkisinin yapraklarından elde edilen ve sakarozdan 300 kat kadar tatlı olabilen Stevia da doğal bir tatlandırıcı olarak sükraloza ciddi bir rakip olarak piyasaya girmiştir. Stevia, anavatanı olan güney Amerika'da yüzyıllardır kullanılmaktadır. Doğal bir tatlandırıcı olması sebebiyle diyabet hastalarının özellikle tüketmeye başladığı Stevia, şekerden kalori almak istemeyen tüketiciler tarafından da tercih edilmeye başlanmıştır. Ancak bahsedilen tüm tatlandırıcılar hala ekonomik olarak çok uygun olmamakla birlikte, çoğunun Türkiye'de üretimi yapılmamaktadır. ÇAYKUR, 2014 yılında deneme amaçlı yetiştiriciliğine başladığı Stevia bitkisinin ilk hasadını almıştır. Yapılan analizlerde şekerlere göre 10 kat daha fazla tatlandırıcı özelliği bulunduğu tespit edilen Stevia yapraklarının, kalori ve protein değerleri sıfır olduğu ve sonuçların umut vaat edici olduğu ÇAYKUR yetkilileri tarafından açıklanmıştır (ÇAYKUR, 2014). Tatlandırıcıların pahalı olması ya da kimyasal kökenli olması bu tatlandırıcıların kullanımını kısıtlamaktadır. Nadir şekerler, bahsedilen tatlandırıcılara alternatif doğal şekerlerdir. Uluslararası Nadir Şeker Enstitüsü (ISRS) , nadir şekerleri doğada az miktarda bulunan monosakarit ve türevleri olarak tanımlar (Granström ve ark., 2004; O'Charoen ve ark., 2014a; Ooshima ve Sun, 2013). Bu şekerlerin, farklı glikozitler üzerindeki inhibe edici etkisinin gösterilmesi (Muniruzzaman ve ark., 1996) , düşük kalorili karbonhidrat bazlı tatlandırıcı

olarak kullanılabilmesi (Levin ve ark., 1995; Matsuo ve ark., 2002; Sun ve ark., 2006b), ısı ileme ile gözlemlenen, birlikte kullanıldıkları polimerlerin jelleşme özelliğindeki iyileşme (O'Charoen ve ark., 2014a; Sun ve ark., 2008; Y. Sun ve ark., 2004), klinik çalışmalarda gösterdiği immunosupresif etkileri (Chattopadhyay ve ark., 2011; Gao ve ark., 2013; Kimura ve ark., 2005; Sun ve ark., 2005), bu şekerler üzerinde yapılan çalışmaları arttırmıştır

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Fruktozun C-4 epimeri olan D-Tagatoz, nadir bir şeker olup tatlılığı sakarozun % 92'si, kalori değeri ise 1,5 kcal/g'dır (Levin, 2002). Tagatozun kandaki yemek sonrası glikoz artışı üzerinde inhibe edici etkisinin olması bu şekerin ikinci tür diyabet tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir (Roberts ve Wright, 2012). Fruktozun C-3 epimeri olan D-Psikoz ise diğer bir nadir şeker olup, sakarozun %70'i kadar tatlı ve kalori değeri 0.39 kcal/g'dır (O'Charoen ve ark., 2014b). D-Psikozun da kandaki glikoz seviyesini düşürücü ve vücuttaki yağ toplanmasını azaltıcı etkisi yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Chung ve ark., 2012; Matsuo ve Izumori, 2009). D-Tagatose 2002 yılında (Levin, 2002), D-Psikoz ise 2012 yılında (Mu ve ark., 2012), A.B.D Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından GRAS olarak kabul edilmiştir. Bu keto-hekzo şekerlerin faydalı özellikleri bu şekerlerin seri üretimi ve gıdalarda kullanımının önünü açmıştır. D-Glikozun C-3 epimeri olan D-alloz da nadir şeker olarak sınıflandırılır. Tagatoz ve Psikozdan farklı olarak, glikoz epimeri olduğu için bir aldo-hekzo'dur ve L-ramnoz izomeraz enzimi ile D-Psikozdan üretilebilir (Chattopadhyay ve ark., 2011). Bu 3 nadir şeker arasında, gerek gıdalarda kullanımının getirdiği faydalar gerekse seri üretiminin daha kolay yapılabilir olması sebebiyle en popüler olanı D-Psikozdur. D-Psikoz, rekombine olarak üretilen ve immobilize şekilde kullanılan D-tagatoz 3 epimeraz enzimi kullanarak D-Fruktoz'dan üretilir (Granström ve ark., 2004; Ikeda ve ark., 2014; Itoh ve ark., 1995; Ooshima ve Sun, 2013; Oshima ve ark., 2014a, 2014b; Takeshita ve ark., 2000). D-Psikozun ilk seri üretimi, Japonya Kagawa Üniversitesi Profesörü Ken Izumori'nin 1994 yılında D-tagatoz 3 epimeraz enzimini früktozla kullanarak elde etmesiyle başlamıştır. Ken Izumori, daha sonra bu enzimi kullanarak tüm hekzo şekerlerin sentezlenebileceğini gösteren Izumoring stratejisini ortaya atmıştır (Izumori, 2006; Takamine, S. ve ark., 2010). D-Psikoz şu anda Kagawa Nadir Şeker Araştırma merkezinde seri olarak üretilmekte ve bu şekerin gıdalarda kullanımı ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. D-Psikozun gıdalarda kullanımını araştıran çalışmalarda (O'Charoen ve ark., 2014a, 2014c) Izumoring stratejisi ile üretilen D-Psikozun maliyetinin düşük olduğu belirtilmiştir. Literatürde, D-Psikozun model ve gerçek gıda sistemlerinde kullanımı ve bu gıdalara etkileri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Çalışmalar incelendiğinde en belirgin ve öne çıkan sonuç D-Psikoz içeren sistemlerde Maillard Reaksiyonları sonucunda antioksidan özellik gösteren daha çok madde oluştuğu ve bu maddelerin gıdaya antioksidatif özellik kazandırdığıdır (O'Charoen ve ark., 2014a; Puangmanee ve ark., 2008; Sun ve ark., 2008, 2007, 2006a, 2005; Y. Sun ve ark., 2004;

Zeng ve ark., 2011). Sun ve ark. (2005) , yumurta, şeker ve süttten yapılan muhallebiyi D-Psikoz, fruktoz ve sakaroz ile ayrı ayrı yapmış ve D-Psikoz ile hazırlanan muhallebinin antioksidan özellik gösteren madde içeriğini en yüksek bulmuş ve D-Psikozla hazırlanan muhallebilerin fonksiyonel tatlı olarak nitelendirilebileceğini belirtmişlerdir. Sun ve ark. (2008) diğer bir çalışmada D-Psikoz ile hazırlanan kurabiyelerin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu, D-Psikozun esmerleşme reaksiyonlarını artırdığını göstermiştir. Antioksidan aktivite dışında D-Psikozun kullanımının, emülsifikasyon (Puangmanee ve ark., 2008; Sun ve ark., 2008), köpüklenme kapasitesi (O'Charoen ve ark., 2014b; Puangmanee ve ark., 2008; Sun ve ark., 2008), jelleşme (Sun ve ark., 2006a; Y. Sun ve ark., 2004) ve tekstür gibi özellikleri değiştirdiği de gösterilmiştir. Bu özellikler peynir altı suyu ve yumurta proteinlerini nadir şekerleri kullanarak glike ettikten sonra ölçülmüş ve proteinlerin tabii halindeki özellikleriyle karşılaştırılmıştır.

Proteinlerin, Maillard Reaksiyonu ile şekerlerle glikasyonunun, kullanıldıkları sistemdeki emülsifikasyon, tekstür, görünüş, tat, jelleşme gibi özelliklerini iyileştirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sun ve ark., 2005). Şeker kullanarak proteinleri Maillard Reaksiyonuna maruz bırakmak proteinlerin özelliklerini değiştirmek için literatürde oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (Handa ve Kuroda, 1999; Nakamura ve ark., 1992; Rangsansarid ve ark., 2008; Spotti ve ark., 2013; Sun ve ark., 2006b, 2005; Yuanxia Sun ve ark., 2004). D-Psikoz ve D-Alloz nadir şekerleri peynir altı suyu proteinleri ile glike edilerek, glike proteinler dondurma yapımında kullanılmıştır (Puangmanee ve ark., 2008). D-Psikozla glike edilen proteinlerin emülsifikasyon özelliklerinin ve köpük stabilitesinin allozla glike edilen ve glikasyona maruz kalmamış tabii proteinden fazla olduğu gösterilmiştir. Sun ve ark. (2004) tarafından yapılan başka bir çalışmada, yumurta beyazı proteininin D-Psikozla glikasyonu sonucunda jelleşme özelliğinin, çapraz bağlaşım özelliğinin glikasyon sonucu artmasına bağlı olarak arttığı ve jellerin kırılma ve deformasyon noktalarının yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca, D-Psikozla glike olmuş yumurta beyazı proteinin 80 oC de 30 dakika ısıtılmasıyla oluşan jellerin antioksidan aktivitesi ve su tutma kapasitelerinin de fruktoz ve glikozla hazırlanan jellere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. β -lactalbumin ve D-Alloz (Sun ve ark., 2006b), ovalbumin ve D-Psikoz glikasyonu için de benzer çalışmalar yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Soya yağı üretiminde ekstraksiyondan sonra kalan posadan elde edilen soya proteini konsantre ya da izolat olarak bulunur. İzolatların protein içeriği %90'dan fazladır. Soya

proteini izolatının % 85'lik kısmını birer globin proteini olan glisinin (11S) ve β -konglisinin (7S) oluşturur (Jaramillo ve ark., 2011) . Soya proteini izolatlarındaki proteinler yağ ekstraksiyonu sırasında çoğunlukla denatüre olurlar ve gıdalarda bu halleriyle kullanılırlar. A.B.D'de bir gıda ürününün önerilen tüketim miktarındaki soya proteini içeriği 6.225 gramdan fazla ise bu gıdanın etiketinde gıdanın sağlıklı bir ürün olduğuyla ilgili bilgiler bulunabilir (Jaramillo ve ark., 2011). F.D.A tarafından günde 25 gr soya proteini tüketiminin kalp hastalıkları riskini azalttığı belirtilmiştir (Genta ve ark., 2002). Ayrıca, soya proteinlerinin kötü kolesterol olarak da bilinen LDL'i azalttığı HDL seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Anderson ve ark., 1995; Reynolds ve ark., 2006). Amerikan Kanser Araştırmaları Enstitüsü, soya proteini tüketiminin osteoporoz, göğüs, kolon ve prostat kanseri hastalıklarıyla savaşmada da yardımcı olduğunu belirtmiştir (Genta ve ark., 2002). Klinik çalışmalarda da soya proteini yüklü diyetlerin kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (Badger ve ark., 2005; Hamilton-Reeves ve ark., 2008; Messina ve ark., 2006). Soya proteinin sağlık üzerindeki etkileri dışında gıdalara eklendiğinde kaliteyi artırıcı özellik gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Özellikle tekstür üzerinde olumlu etkileri olduğu bulunmuştur (Caillard ve ark., 2009; Tang ve ark., 2007). Soya sütünün tuz, enzim veya asit yardımıyla çökeltip suyunun çıkarılması ile elde edilen ve jel yapısında olan Tofu soya proteini yönünden zengin, Asya mutfağının önemli gıdalarından biridir. Soya proteinlerinin jelleşme özelliklerinin olması ve hidrojel oluşturabilmesi bu proteinlerin peynir, işlenmiş et gibi gıdalarda, ilaç malzemelerinin taşınmasında ve salınımında, fonksiyonel özellik gösteren bileşenleri taşımak için enkapsülasyon matrisi olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır (Caillard ve ark., 2010a; Nesterenko ve ark., 2014; Rinaldoni ve ark., 2014; Teng ve ark., 2012; Youssef ve Barbut, 2011).

Proteinlerin şekerler yardımıyla Maillard Reaksiyonuna maruz bırakılıp glikasyon yapıldığından bahsetmiştik. Soya proteinlerini de, çözünürlük, köpüklenme emülsifikasyon, ısıl dayanıklılık gibi özelliklerinin iyileştirilmesi için herhangi bir kimyasal kullanmadan bu reaksiyonlar yardımıyla glike edip fonksiyonelleştirmek mümkündür (Liu ve ark., 2012). Li ve ark. (2015) β -konglisinini glikoz, maltoz ve dekstrin ile glike ederek proteinin özelliklerini incelemiştir. Glikozun maltoz ve dekstrinden daha çok reaksiyona girdiği, proteinin çözünürlüğünü ve denatürasyon sıcaklığını arttırdığını yüzey hidrofobisitesini azalttığını göstermiştir. Glike olmuş proteinlerin reolojik özelliklerinde de şeker tipine bağlı olarak değişimler gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2015). Guan ve ark. (2005) mikrodalga ile ısıtma yöntemini kullanarak 1,5 dakikada soya proteinlerini maltoz, laktoz, dekstrin ve çözünmüş

nişasta ile glike etmiş ve glikasyon derecesinin 90 oC'de 2-3 dakikalık su banyosunda ısıtmaya göre amino gruplarının reaksiyona girme sabitlerinin çok daha fazla olduğunu göstermiştir (Guan ve ark., 2006). Soya fasulyesi en alerjenik gıdalar içerisinde 8. sırada yer alır (Food and Agricultural Organization of U.S, 1995). Glikasyon soya proteininin alerjenik özelliklerini azaltmak ya da ortadan kaldırmak için de kullanılmaktadır. Van de Lagemaat ve ark. (2007) soya proteinini toz ve sıvı sistemlerde fruktoz ve diyet lifi olarak sınıflandırılan früktooligosakkarit karışımı ile glike etmiş ve antijen özelliğinin glike olmamış proteinlere göre %90 azaldığını göstermiştir (van de Lagemaat ve ark., 2007). Soya proteinlerinin nadir şekerleri kullanarak glikasyonu ve jelleşme davranışlarını inceleyen bir çalışmaya literatürde henüz rastlanmamıştır. Önerilen proje kapsamında, soya proteinlerinin nadir şekerlerle glikasyonu ve bu işlemin protein özelliklerini nasıl değiştireceği incelenecektir.

Önerilen projenin asıl hedefi, soya proteini ve bu proteinin nadir şekerle glike olmuş halini ve D-Psikoza kullanarak şekerleme ürünleri tasarlamak ve bu ürünleri fiziksel, kimyasal karakterizasyonunu ve depolama çalışmalarını yapmaktır.

Şekerleme ürünü dendiğinde akla gelen ürünler yumuşak ve sert şekerlerdir. Sert şekerler düşük nem içerikli, (maksimum nem içeriği ~%5) amorf yapıda ürünlerdir (Gu ve ark., 2015). Su, şeker (sakaroz/glikoz şurubu) karışımının yüksek sıcaklıkta (~ 150 oC'de) karıştırılıp, kalıplara alındıktan sonra soğuması ile elde edilir. Sert şekerlemelerde nem içeriği ağırlıkça %3-5 arasında değişir. Yumuşak şekerlemelerde ise jelleşme ajanına ihtiyaç vardır. Bu şekerlemelerin nem içeriği ise %20-30 arasında değişmektedir. Jelatin en sık kullanılan jelleşme ajanıdır (Lennox, 2002). Yumuşak şekerlemeler için en önemli iki parametre olan sertlik ve saydamlık jelatin kullanılarak kolaylıkla elde edilir (Marfil ve ark., 2012) . Ancak çoğunlukla domuz ve sığırdan elde edilen jelatinin tüketimi, kültürel , dinsel ve diyet seçimleri (vejetaryen , vegan vb..) gibi faktörlerden etkilenmekte ve bu durum jelatin içeren ürünlerin hedef kitlesini kısıtlamaktadır (Siegwein ve ark., 2011). Şekerleme ürünlerinde jelatine alternatif olarak kullanılan diğer bir biyopolimer nişastadır. Ancak nişastanın tabii hali çözünürlük ve viskozite açısından, üretimde sıkıntılı olduğu için şekerleme ürünlerinde çoğunlukla modifiye nişasta kullanılır. En sık kullanılan modifiye nişasta tipi ise asitle inceltilmiş nişastadır. Bu tip nişasta çözeltilerinin viskozitesi düşük olduğundan üretimde pompalama için gerekli enerji ihtiyacı da daha az olur (Ellis ve ark., 1998; Siegwein, 2010; Siegwein ve ark., 2011). Diğer taraftan asit modifiye nişastaların jel hallerinin viskozitesinin, aside ve ısıya dayanıklılığının daha yüksek olduğu bilinmektedir (Hermansson ve Svegmarm,

1996; Marfil ve ark., 2012). Nişasta ile hazırlanan şekerlemelerde, şekerleme literatüründe 'kısalık' diye adlandırılan, nişastanın retrogradasyonundan kaynaklı sert ve kırılğan bir yapı gözlenmesi mümkündür (Burg, 1998).

Yumuşak şekerleme ürünlerinde jelatine alternatif nişasta dışında kullanılan diğer bir biyopolimer pektindir (Delgado ve Bañón, 2014; DeMars ve Ziegler, 2001; Marfil ve ark., 2012; Sessler ve ark., 2013; Siegwein ve ark., 2011; Tan ve Lim, 2008). Pektin reçellerde, dondurulmuş ürünlerde, jölelerde jelleşmeyi sağlama amaçlı sık kullanılan bir polimerdir (Thakur ve ark., 1997).

Şekerleme ürünleri son yıllarda biyoaktif maddelerin saklanması ve bu maddelerin sonrasında kontrollü bir şekilde salınması amacıyla bir ortam olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu eğilim hidrojel matrislerine ikincil bir polimer ekleyerek matris yapısını ve biyoaktif maddenin salınım davranışın değiştirilmesi ile devam etmektedir. Bu amaçla daha önceden faydalı özellikleri tartışılan soya proteini izolatu kullanılabilir. Nişasta ve pektin ile hazırlanan yumuşak şekerlemelere soya proteini ekleyerek bu jellerin pH'dan nasıl etkilendiği, tekstürleri, camsılığa geçiş sıcaklıkları, mikroyapıları ve reolojik davranışları incelenmiştir. Pektinle hazırlanan soya proteinli şekerlemelere üzüm suyu eklenmiş ve üzüm suyundan gelen biyoaktif maddelerin salınım hızının soya proteinin eklenmesinden etkilendiği gösterilmiştir. (Sessler ve ark., 2013). Nişasta ile hazırlanan yumuşak şekerlerde ise soya proteini eklemenin, sertliği, yapışkanlığı (cohesiveness) ve sakızimsılığı azalttığı görülmüştür (Siegwein, 2010; Siegwein ve ark., 2011). Depolama süresince de soya proteini içeren şekerlemelerin tekstüründe 20 gün sonunda önemli bir değişim olmadığı gösterilmiştir ve soya proteini eklemenin genel olarak sadece nişasta ile hazırlanan yumuşak şekerlemelerin kalitesini artıracağı ifade edilmiştir.

Şekerleme ürünleri kalori değeri yüksek ürünlerdir. Kalori jelleşme ajanlarından ve en önemlisi kullanılan şekerden kaynaklanmaktadır. Maltitol ve ksilitol şeker alkollerini kullanarak jelatin ve nişasta ile hazırlanan sakızimsı şekerleme ürünleri ve bu ürünlerin reolojik özellikleri literatürde çalışılmıştır (Marfil ve ark., 2012).

Peynir altı suyu tozu proteinin D-Psikoz ile glike edilmesi ile dondurma (Puangmanee ve ark., 2008), şeker yerine D-Psikoz kullanarak beze (O'Charoen ve ark., 2014a), kurabiye (Sun ve ark., 2008), muhallebi (Sun ve ark., 2007, 2006a) gibi ürünlerin formüle edilip fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenmiştir. Ancak soya proteini, nadir şekerlerle glike olmuş soya

proteini ve D-Psikoz ile formüle edilmiş bir şekerleme ürününe ait bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Önerilen proje kapsamında böyle bir ürün tasarlanacaktır. Tasarlanacak ürünün karakterizasyonunda izlenecek yöntemlerin bazıları ileriki kısımlarda açıklanacağı gibi literatürde kullanılanlardan önemli farklılıklar gösterecektir.

Önerilen projede kullanılacak ve projenin COST aksiyonunla ilişkilendirilmesini sağlayan teknikler Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve NMR Relaksometredir.

MRG canlıların içyapısını görüntüleme amacıyla daha çok tıpta kullanılan bir yöntemdir. Düşük frekanslı ve az çözünürlüklü, düşük maliyetli, görüntüleme sistemlerinin yaygınlaşmasıyla birlikte bu metot, yüksek nem içerikli biyolojik materyallerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. MRG ile gıdaların içyapısını inceleyerek kalite parametrelerini tahribatsız bir şekilde belirlemek mümkündür. MRG ile görüntü alımı, numunedeki serbest protonların bir radyo frekansı pulsuyla uyarılıp pulsun geri çekilmesiyle elde edilen sinyalin farklı düzlemlerde kodlanmasını esas alır. Şekerleme ürünlerinde MRG kullanımında karşılaşılan en büyük sorun protonların mobilitelerinin az, dolayısıyla sinyalin de az olmasıdır. Bu nedenle bu tip ürünlerin görüntülenmesinde SPRITE adı verilen özel bir görüntüleme sekansı kullanılır (Cornillon ve Salim, 2000; Deka ve ark., 2006; MacMillan ve ark., 2008; Troutman ve ark., 2001; Ziegler ve ark., 2003). Ziegler ve ark. (2003) pektin ve nişasta ile hazırlanan yumuşak şekerlemelerin nişasta kalıplarında kuruması sürecini MR görüntüleri ile izlemiş ve numunelerin kuruması sırasındaki su dağılımını belirlemiştir. Görüntülerden elde edilen su transferi bilgisi ışında şekerlemelerin üst kısmının da nişasta ile kaplanmasının, kuruma sürecinin hızına ciddi bir etkisi olacağını göstermişlerdir. Bu projede de tasarlanacak şekerleme ürünlerindeki su dağılımını incelemek için MRG tekniği kullanılacaktır.

NMR Relaksometre T1 ve T2 zamanlarının ölçülmesine dayanan bir tekniktir. T1 ve T2 zamanları NMR için gerekli radyo frekansı (RF) pulsunun kısa süreli uygulanması sonucunda oluşan sinyalin farklı düzlemlerdeki azalış (T2) ve artışını (T1) karakterize eden zaman sabitleridir. T1: longitudinal salınım T2 ise transverse salınım zamanı olarak bilinir. T1 zamanı eksponansiyel olarak artan bir sinyal ile karakterize edilirken T2 zamanı eksponansiyel olarak azalan bir sinyal eğrisinden elde edilir. NMR Relaksometre deneyinin çıktısı olan NMR Relaksasyon spektrası bu sinyal eğrilerine Ters Laplas yönteminin uygulanmasıyla elde edilir (Kirtil ve Oztop, 2015). NMR Relaksasyon spektrası numunelerdeki proton havuzları hakkında bilgi verir (Ersus ve ark., 2010; Oztop ve ark.,

2014, 2012, 2010; Wichchukit ve ark., 2013). Bu teknikle, jel sistemlerinde çapraz bağlaşım kinetiğinin takibi, meyve sebze numunelerinde ise hucresel yapının butnlğ hakkında (Ersus ve ark., 2010; Kirtil ve ark., 2014) bilgi elde edilebilir. Yumuşak şekerleme ürünlerinin de jel sistemleri olduğu düşünülürse, NMR Relaksometre'nin bu sistemlerdeki farklı proton havuzlarının belirlenmesinde kullanımı mümkündür. şekerlemelerdeki serbest ve bağlı suyun tespitinde, numunelerdeki su mobilitesini formülasyona bağlı olarak nasıl değiştiğini ve buna bağlı olarak numunelerde depolama sonucunda olabilecek değişikliklerin nedenini anlamak için bu teknik kullanılabilir. Böylece eklenen farklı biyopolimerlerin, tekstür üzerindeki etkisinin mekanizmasını açıklamak mümkün olabilecektir. Bu projede de tasarlanacak glike olmuş proteinlerin hidrasyon davranışının incelenmesinde ve şekerleme ürünlerinin kalitesinin belirlenmesinde NMR Relaksometre teknikleri kullanılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Soya Proteinin Nadir Şekerler Kullanarak Glikasyonu Ve Glike Edilen Proteinlerin Fiziksel Ve Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

3.1.1 Fiziksel Analizler

3.1.1.1. NMR Relaksometre ile Glike olmuş Proteinlerin incelenmesi

Glikoz (dekstroz), Fruktoz ve D-Psikoz (Nadir Şeker)'un kullanıldığı, soya proteini: şeker oranlarının 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 ve 10:1 olarak değiştiği örnekler, iki farklı tampon çözeltisinde (pH 7 ve pH 10) hazırlanmıştır. Glikasyon sonucu oluşan örneklerden hazırlanan ağırlıkça %1'lik çözelti için, O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yer alan 0,32 Tesla gücündeki Spin Track NMR aletini kullanarak, T2-CPMG spin-spin salınım zamanı deneyleri yapılmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen T_2 spektrumlarından, farklı protein: şeker oranları ve farklı şeker türleri arasında örneklerin hidrasyon özelliklerinin nasıl değiştiği tespit edilmiştir.

Veriler üzerinde çoklu varyans analizi yapılmış olup, karşılaştırma sonuçları ekler kısmında (EK 1) detaylı olarak verilmiştir. Analiz için MINITAB yazılımı kullanılmıştır. Şeker tipi (glikoz, fruktoz, D-Psikoz), glikasyon tipi (dondurarak kurutuma/püskürtmeli kurutma) ve şeker: protein oranı ve pH (7, 10) etkisi incelenen faktörlerdir. Karşılaştırma için Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Verilere ANOVA yapmadan önce verilerin 'normal dağılım' ve 'sabit varyans' varsayımlarını saylayıp sağlamadığı kontrol edilmiştir. Bu kontroller projedeki tüm istatistiksel analizler için yapılmıştır. Ayrıca Pearson korelasyon analizi de yapılmıştır. Kimyasal Analizler kısmındaki istatistiksel analizlerde çoğunlukla çoklu faktörlü varyans analizi kullanıldığından istatistiksel farklılıkları göstermek için kullanılan harfler, grafikler üzerinde gösterilememiştir. Ancak ilgi Ek dosyada detaylandırılması bulunabilir. Yorumlar ilgili EK dosyadaki Çoklu Faktörlü Varyans analizi sonuçlarına göre yapılmıştır.

3.1.1.2. Emülsifikasyon Aktivitesi Deneyi

Glike olmuş proteinlerin emülsifikasyon aktivitesinin belirlenmesi için Pearce ve Kinsella'nın (1978) çalışmasındaki metot bazı değişiklikler yapılarak takip edilmiştir (Pearce & Kinsella, 1978). Dekstroz, fruktoz ve D-psikozun (nadir şeker) kullanıldığı ve protein-şeker oranlarının 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 ve 10:1 olarak seçildiği örnekler pH 7 ve pH 10'daki tampon çözeltileriyle

hazırlanmıştır. 10 mM'lik tampon çözeltilerinden hazırlanan ağırlıkça %1'lik glike olmuş protein çözeltisinden 1 ml, 0,5 ml mısır yağı ile karıştırılıp 60,000 rpm'de 1,5 dakika karıştırılmıştır. Sonrasında karışımın toplam yükseklik ölçümü yapılmıştır. Devamında ise karışım örneklerine 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işleminden sonra ayrılan yağ kısmı, emülsifikasyona uğramamış kısım olduğundan bu kısmın yüksekliği ölçülüp toplam yükseklikten çıkarılmıştır. Kalan karışım yüksekliğinin santrifüj öncesi toplam yüksekliğine oranı emülsifikasyon oranı olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar yüzde cinsinden verilmiştir.

Veriler üzerinde çoklu varyans analizi yapılmış olup, karşılaştırma sonuçları ekler kısmında (EK 2) detaylı olarak verilmiştir. Şeker tipi (glikoz, fruktoz, D-Psikoz), glikasyon tipi (dondurarak kurutma/püskürtmeli kurutma) ve şeker: protein oranı ve pH (7, 10) etkisi incelenen faktörlerdir. Karşılaştırma için Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

3.1.1.3. Glike olmuş Protein Çözeltilerinin Viskozite Ölçümü

Glikoz, Fruktoz ve D-Psikoz (Nadir Şeker)'un kullanıldığı, soya proteini: şeker oranlarının 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 ve 10:1 olarak değiştiği örnekler tampon çözeltisinde (pH 10) hazırlanmıştır. Glike olmuş örneklerden 3 tekerrür kullanılarak %2'lik örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 15,000 rpm'de 2.5 dk karıştırılmıştır. Viskozite ölçümleri Malvern Kinexus Reometresi kullanılarak yapılmıştır.

Hazırlanan çözeltilerin tümü, Newton akışkan davranışı gösterdiği için elde edilen verilere Newton modeli uygulanarak viskozite değerleri bulunmuş ve veriler MINITAB yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Şeker tipi, protein-şeker oranı, pH ve glikasyon tipi olmak üzere dört farklı değişken kullanılarak çoklu varyans analizi yapılmıştır. İstatiksel sonuçlar detaylı bir şekilde Ek 3 de verilmiştir. Bu deneylerde püskürtme yöntemi ile kurutma ve kurutma işleminin uygulanmadığı örneklerle çalışılmıştır. Dondurarak kurutma ile elde edilen numune sayısı az miktarda olduğundan, reometre ile deney yapılacak kadar numune elde etmesi oldukça zor olmuştur bu nedenle bu deneyler sadece püskürtmeli kurutma ve glike olmayan numuneler için yapılmıştır. İstatiksel olarak, farklı değişkenler arasında anlamlı bir fark olup olmadığını kontrol etmek için Tukey testi uygulanmıştır. Sonuçlara göre etkisi incelenen faktörlerin viskozite üzerinde önemli etkisi olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

3.1.2 Kimyasal Analizler

3.1.2.1. Glike olmuş Protein Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi: CUPRAC Methodu

Bu metot için Apak ve ark'nın (2004) geliştirdiği (Apak, Güçlü, Özyürek, & Karademir, 2004), Kamiloğlu ve ark.'nın (2015) kara havuç kullanılarak hazırlanan reçel ve marmelatlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan metot (Kamiloglu, Pasli, Ozcelik, Van Camp, & Capanoglu, 2015) referans alınmıştır. Bu metot için kullanılan malzemeler bakır (II) klorür, neokuproin, ammonyum asetat ve distile sudur. Bu metot için Glikoz, Fruktoz ve D-Psikoz (Nadir Şeker)'in kullanıldığı, soya proteini: şeker oranları 1:1, 2:1, 3:1, 5:1 ve 10:1 olarak değiştiği örnekler iki farklı tampon çözeltisinde (pH 7 ve pH 10) hazırlanmıştır. Glikasyon sonucu oluşan bu örneklerden hazırlanan ağırlıkça %1'lik çözelti 100 mikrolitre, 1 ml 10 mM bakır (II) klorür, 1 ml 7,5 mM neokuproin ve 1 ml 1 M ammonyum asetat (pH:7,0) karıştırılıp, 4.1 ml ye tamamlanacak şekilde 1 ml distile su ile karıştırılmıştır. 1 saat boyunca, oda sıcaklığı inkübasyonunda bekletilen bu karışımların daha sonra 450 nm'de absorbans okunmuştur. Çoklu varyans analizi sonuçları Ek 4'te detaylı olarak verilmiştir.

3.1.2.2. Glike olmuş Proteinlerin Antioksidan Aktivitelerin Belirlenmesi: DPPH Metodu

Antioksidan aktivite ölçümleri için DPPH yöntemi (Wong, Tan, Long, & Nyam, 2014) kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, 1600 ppm, 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm ve 25 ppm 'de Trolox çözeltisi (Trolox + distile su) kullanılarak hazırlanmıştır. Prosedürün ilk adımı, etanol: distile su: asetik asit karışımının 50:42:8 oranında hazırlanmasıdır. 2,5 mg DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ayrıca bir başka beherde 100 mL metanol içinde çözülerek, 1 mL çözücü ve 0.1 g%1'lik numune çözeltisi karıştırılıp vortekslenmiştir ve 0.45 µm filtrelerle süzölmüştür. Süzöldükten ve gerekli seyreltmelerden sonra, 3,9 ml DPPH çözeltisi, 0.1 ml süzöntü ile karıştırılıp ve bir saat boyunca karanlıkta tutulmuştur. 'Blank', aynı miktarlarda metanol ve DPPH karışımı kullanarak hazırlanmış, karanlıkta bir saat bekletildikten sonra, absorbans 517 nm'de okunmuştur. Çoklu varyans analizi sonuçları detaylı olarak EK 5 de verilmiştir.

3.1.2.3. Glike olmuş Proteinlerin Serbest Amino gruplarının : OPA Metodu

Glike olmuş örneklerin serbest amino grubunu belirlemek için OPA yöntemi uygulanmıştır. OPA karışımı, OPA (o-ftaldialdehid), etanol, boraks tamponu (pH 9.75), P-merkaptetanöl ve SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi kullanılarak hazırlanmış, 80 mg OPA, 2 ml %95 etanol çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. Tam çözünmeden sonra, 50 mL 100 mM boraks tamponu (pH 9.75'te) çözeltiye eklenmiştir. Karışım, 200 µL p-merkaptetanöl ve 5 mL %20 SDS çözeltisi ilave edilerek son hacmi 100 mL'ye getirilmiştir. Karışımın hazırlanmasından sonra, 0.5 mL numune 2 dakika boyunca 1.5 mL OPA karışımı ile karıştırılmış ve absorbans 340 nm'de okunmuştur. Standart eğri 0.1 g/L glisin çözeltisinin seyreltilip absorbans değerlerinin okunmasıyla çizilmiştir (Fayle vd., 2001). Çoklu varyans analizi sonuçları Ek 6 da verilmiştir.

3.1.2.4. Lowry Yöntemi ile Çözünürlük Tayini

Öncelikle metot için gerekli reaktifler hazırlanmıştır. Reaktif 1, %2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edilerek distile suda içinde hazırlanmış, Reaktif 2, % 2 Na-K Tartarat ilavesiyle distile suda hazırlanmıştır. Reaktif 2'nin hazırlanmasının nedeni, alkali ortamda Cu^{+2} oluşumunu önlemektir. Reaktif A, 0.1 N NaOH içerisinde % 2 Na_2CO_3 ile hazırlanmıştır. Lowry ACR reaktifini hazırlamak için Reaktif A, Reaktif 2 ve Reaktif 1 sırasıyla 100: 1: 1 oranlarında karıştırılmıştır. Folin-Fenol Reaktif hazırlanışı için sırasıyla: 2N stoku 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmış, hazırlanan reaktiflerden sonra, kalibrasyon eğrisi BSA (Bovine Serum Albumin) stok çözeltisi ile 1 mg / ml ile başlanıp 0.03125 mg / ml' ye kadar seri seyreltmeler ile yapılmıştır. Daha sonra deney, pH 7 ve pH 10 tamponları ile %1'lik örnek-tampon solüsyonları (w / v) olacak şekilde hazırlanan glike olmuş proteinlere uygulanmıştır.

Kontrol örneği, tüpe 0.5 ml distile su ilave edilerek hazırlanmış, daha sonra 2.5 ml Lowry ACR reaktifi ilave edilmiştir. Son olarak, 0.25 ml Folin Reaktifi eklenmiştir. Glike olmuş numuneler için, tüplere 0.5 ml distile suyun eklenmesi yerine, 0.5 ml %1 numune-tampon solüsyonu (w / v) eklenerek tüpler 8 saniye boyunca vortekslenmiştir. Daha sonra, tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş, absorbans değerleri sırasıyla 680 nm ve 750 nm'de olacak şekilde okunmuştur. En sonunda, absorbans değerlerinin sonuçları kalibrasyon eğrisine konulup okunmuştur. Çoklu varyans analizi sonuçları Ek 7 de verilmiştir.

3.1.2.5. İndirgen Şeker Miktarı Tayini

Glike örneklerde indirgen şeker miktarını belirlemek için, DNS metodu (Saqib & Whitney, 2011) takip edilmiştir. Glikasyon oldukça bağlanan şeker miktarı artacağından DNS sonuçlarının bağlanma oranı ile ilgili bilgi vereceği düşünülmüştür. Çoklu Varyans Analizi sonuçları da Ek 8 de verilmiştir.

3.1.2.6. Glikasyon Derecesinin Tespiti

Glikasyon sonucu oluşan ürünler, pH 7 ve pH 10 tamponları ile %1'lik tampon solüsyonları (w/v) olarak hazırlanmıştır. Glikasyon derecesinin tayini için Optizen POP Nano Bio UV Spektrofotometre kullanılıp 420 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Ek 9'da çoklu varyans analizi sonuçları verilmiştir. Şekerin dekstroza olarak kullanıldığı örneklerinin glikasyon derecesinin belirlenmesi için 420 nm de absorbans değerleri okunmuştur.

3.1.3.7. Glikasyon ürünlerinin Tespiti: furozin, karboksimetillisin (CML), karboksietillisin (CEL) analizleri

Farklı oranlarda (10:1, 3:1, 1:1) soya proteini ve şeker (dekstroza, fruktoza, psikosa) içeren örneklerin başlangıç ve ileri glikasyon ürünlerini belirlemek amacıyla furozin, karboksimetillisin (CML), karboksietillisin (CEL) analizleri Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde duplikeli olarak çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart hata değerleri ile verilmiş olup farklı gruplar arasındaki istatistiksel farklılık varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Burada çoklu faktör yerine numuneler kendi aralarında tekli varyans analizine göre değerlendirilmiştir.

3.1.3.8. Jel Elektroforez Deneyleri

3.1.3.8.1 Proteinlerin İzlenmesi

Proteinler sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile izlenmiştir (Laemmli, 1970). SDS PAGE deneyleri % 5'lik istifleme ve % 12'lik ayırma jelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforezden sonra jeller Coomassie Brilliant Blue G250 ile boyanmıştır. Proteinin alt birimlerinin moleküler ağırlığının belirlenmesi için jelle bir moleküler ağırlık kalibrasyon işaretleyicisi yüklenmiştir. Glike edilmiş soya proteinleri aynı konsantrasyonda farklı koşullarda denatüre edilmiş ve BIO-RAD Mini Protean Tetra Cell

kullanım kılavuzundaki protokol takip edilerek örnekler hazırlanmış ve elektroforez deneyleri yapılmıştır.

Örnekler hazırlanırken konsantrasyon 10 mg protein /ml çözelti olacak şekilde ayarlanmıştır. 1 ml tampon çözelti için 50 µl β- merkaptotanol kullanılmıştır. Tampon çözelti saf su, Tris HCl, gliserol, 10 % (g/ml) SDS, 0.5 % (g/ml) bromofenol mavisi kullanılarak hazırlanmış, yürütme tamponu olarak Bio-Rad katalog numarası 161-0772 olan pH 8.3, 10X konsantre Tris/Glisin/SDS kullanılmıştır.

Jeli hazırlamak için kullanılan malzemeler aşağıda verilmiştir;

- Akrilamid/Bis metilen akrilamid
- 10% (g/ml) SDS
- 1.5 M Tris HCl, pH 8.8
- 0.5 M Tris HCl, pH 6.8

Jel dökülmeden hemen önce bu çözeltiye 10 % (g/ml) APS (amonyum persülfat) ve TEMED eklenmiştir.

3.1.3.8.2 Jel Filtrasyon Kromatografisi (FPLC)

Jel elektroforez deneylerinde olumlu sonuçlar alınamaması üzerine, projede araştırmacı olarak görev alan Dr. Bekir Gökçen Mazi'nin da yardımı ile ODTÜ Gıda Müh. Biyoteknoloji Laboratuvarında yer alan Jel filtrasyon kromatografisi cihazı ile de çalışılmaya başlanmıştır ve bazı denemeler yapılmıştır. Jel Filtrasyon Kromatografisi deneyleri proje önerisinde yer almamaktadır.

Jel filtrasyon kromatografisi, molekül ağırlığı ve protein büyüklüğünün belirlenmesi için kullanılan bir metottur. Jel filtrasyon kolonlarının kalibrasyonu için yüksek moleküler ağırlık kalibrasyon kiti (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan, Uppsala, İsveç) kullanılmıştır. Doğal proteinin moleküler ağırlığı (MW), kalibrasyon eğrisinden (K_{av} ile $\log MW$ arasındaki alan) belirlenir. Aynı zamanda, proteinin moleküler boyutu, $-\log K_{av}$ 'a karşı Stoke yarıçapının (R_{St}) grafiğinden de belirlenebilir. Bölme katsayısının (K_{av}) doğru bir şekilde belirlenmesi için, kalibrasyon standartları ve numune aynı koşullar altında yürütülmüştür.

10mM Potasyum fosfat (pH 7.4) tampon çözeltisi hazırlanmış, tuz konsantrasyonu 500 mM olarak belirlenmiştir. Proteinler 280 nm de absorbans okunarak tespit edilmiştir. Proteinler

Superdex 200 preparasyon sınıfı HiLoad 16/60 (120 ml) önceden hazırlanmış bir kolon (General Electric Health care, Amersham Pharmacia AB, Björkgatan, Uppsala, İsveç) ile analiz edilmiştir. Kolon, yüksek oranda çapraz bağlı agaroz kovalent olarak bağlanmış dekstran içerir. Sabit miktarlarda protein içeren 2 ml'lik numuneler, kolona enjekte edilmiş ve 500mM NaCl ile 10mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile 0,5 ml / dk' da elüsyon yapılmıştır. Elüsyon hacmi önce geniş tutulmuş (325 ml) sonrasında incelenmesi gereken bölge tespit edilerek (35-85 mL) azaltılmıştır.

3.2. Soya Proteini Veya Glike Olmuş Soya Proteini, D-Psikoz, Nişasta Veya Pektin İçeren Yumuşak Şekerlemelerin Tasarlanması, Karakterizasyonu, Depolama Çalışmalarının Yapılması

3.2.1. Jelatin içeren şekerlemelerin hazırlanması

Jelatin içeren şekerlemeler projede kontrol amaçlı olarak hazırlanmış olup jelatin konsantrasyonu proje planında da belirtildiği gibi %8 olarak belirlenmiştir (Marfil ve ark., 2012). 8 gram jelatin 100° C' de 15 ml distile suda çözülmüştür. Şeker karışımı için ise, 20 gram mısır şurubu (DE=42), 40 gram toz şeker (sükroz/sükroz+nadir şeker karışımı) 17 ml suda, karışımın sıcaklığı 100° C'ye gelinceye kadar 400 rpm'de karıştırılmıştır. Şeker karışımının sıcaklığı 100° C'ye geldikten sonra jelatin çözeltisine eklenmiş ve ağırlıkça %8 jelatin, %20 mısır şurubu ve %32 su içeren bu toplam karışım, manyetik karıştırıcıda, 85° C, 350 rpm'de 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karışımın briks değeri 70' e ulaştınca alınıp kalıplara dökülmüştür. Oda sıcaklığında 1 gün boyunca bekletildikten sonra kalıplardan alınmış ve analizleri yapılınca kadar 25° C sıcaklıkta, %60 bağıl nemde bekletilmişlerdir. Toz şeker olarak sadece sükroz içeren örnekler (%0 D-Psikoz), kontrol amaçlı hazırlanmış olup, diğer örneklerde artan oranlarda (10%, 20%, 30%, 40%) nadir şeker (D-Psikoz) kullanılmıştır.

Proje planında bu kısım için jelleştirme ajanı olarak balık ve sığır jelatini kullanılacağından belirtilmiş olup şu ana kadar sadece sığır jelatiniyle çalışılmış, balık jelatini denemeleri sonraki aşamaya bırakılmıştır. Ancak laboratuvarımızda başka bir çalışmada bir şekerleme firması tarafından bize ulaştırılan balık jelatini ile yapılan jellerin sığır jelatiniyle yapılan jellerden tekstür ve görünüş olarak çok farklı olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle belirli başlı birkaç fiziksel özellik ölçülüp benzer sonuçlar alınıp benzerlik doğrulandıktan sonra sığır jelatinli jeller için planlanan tüm analizler balık jelatinli jeller için yapılmamıştır.

Tablo 1. Jelatin ile Hazırlanan Şekerleme ürünlerinin Kompozisyonları

Numune İsmi	Formülasyon
P0	%40 Sükroz
P10	%30 Sükroz + %10 D-Psikoz
P20	%20 Sükroz + %20 D-Psikoz
P30	%10 Sükroz + %30 D-Psikoz
P40	%40 D-psikoz

3.2.2 Nişasta ve Soya Proteini içeren şekerlemelerin hazırlanması

Projenin bu bölümünde daha önceden de açıklandığı üzere soya proteini kullanılarak şekerleme formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Yumuşak şekerleme formülasyonları projede belirtildiği üzere ağırlıkça %60 da sabit tutulmuş, nadir şeker kullanmak ekonomik olarak mantıklı olmadığından şeker şurubu yüzdesi %30 olarak sabitlenmiş geri kalan miktar, D-Psikoz/Sükroz olacak şekilde formüle edilmiştir. Soya proteini + Nişasta konsantrasyonu da Siegewein ve ark.'nın (2011) çalışmasını referans alarak %11' de tutulmuştur. Geçen 6 aylık süreçte, 4 farklı şekerleme ürünü için daha formülasyon çalışması yapılmış, bir önceki dönemdeki formülasyonlar yeniden hazırlanarak, yeni formülasyonlarla birlikte yeniden karakterize edilmiştir. Toplamda hazırlanan 8 farklı şekerleme ürününün kompozisyonları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Nişasta ve İzole Soya Proteini ile Hazırlanan Şekerleme Ürünlerinin Kompozisyonları

	Nişasta (%)	D-psikoz (%)	Sükroz (%)	Soya Proteini İzolatı (%)
11_S0_R0	11	0	30	0
11_S0_R10	11	10	20	0
11_S0_R20	11	20	10	0
11_S0_R30	11	30	0	0
9_S2_R0	9	0	30	2
9_S2_R10	9	10	20	2
9_S2_R20	9	20	10	2
9_S2_R30	9	30	0	2

Nişasta ile hazırlanan şekerlemelerin yapımı için daha önceki raporda da belirtildiği gibi Siegwein ve ark.'nın (2011) metodu değiştirilerek kullanılmıştır. Literatür araştırması ve yapılan denemeler sonucunda şekerleme ürünleri için optimum hazırlama koşulları şu şekilde belirlenmiştir; Nişasta ağırlıkça 2 katı su ile karıştırılıp, polimerlerin çözünmesi sağlandıktan sonra 5 dakika süre ile 130 °C yağ banyosunda jelatinize edilmiştir. Bu süre içinde şeker şurubu-toz şeker karışımı geri kalan su ile karıştırılıp şurup sıcaklığı 115 °C gelene kadar kaynatılmıştır. Jelatinize olan nişasta-su karışımına, 115 °C şurup karıştırılmıştır. Soya proteini içeren formülasyonlar için soya proteini bu aşamada katılmış olup, karışımın homojen olması için yüksek hızlı karıştırıcı kullanılmıştır. El refraktometresi yardımıyla ölçülen briks değerı, 80 olana kadar 130 °C'de ısıtma devam etmiştir. Karışım daha sonra toz nişasta içeren kalıplara dökölüp 36 saat, 38 °C etüvde bekledikten sonra oda sıcaklığına getirilip üzerindeki nişasta fırçalanarak, numuneler polietilen paketlerde saklanmıştır.

3.2.3 Pektin ve Soya Proteini içeren şekerlemelerin hazırlanması

Farklı kompozisyonlardaki şeker örnekleri sindirim için hazırlandı. Tablo 3'te hazırlanan şeker örneklerinin içeriği verilmiştir. şeker örneklerinde D-psicose-Sakaroz ve ayrıca soy protein miktarları değişim göstermiştir. Pektin içeriği sabit tutulmuştur çünkü bu orandan (4%) daha az pektin içeren şekerlemelerde beklenen yumuşak şekerleme tekstürü yakalanamamıştır. Soy protein + pektin içeriği 5% tamamlanması gerektiğinden en yüksek pektin oranı olan 4 seçilmiştir. Kontrol numunesi olarak soya proteini içermeyen şekerlemeler de ayrıca tasarlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır.

İlk önce, glikoz şurubu bir beher içine tartıldı ve sonra soya proteini ve su ilave edildi. Beher çözeltisi 9,000 rpm'de 1 dakika boyunca yüksek hızlı homojenleştirici (Ultra-Turrax, WiseTisHG-15D, Wertheim, Almanya) kullanılarak karıştırıldı. Başka bir beherde sakaroz ve

D-Psikoz tartıldı. Daha sonra, bu karışımın üstüne pektin eklendi. Bu beherde, pektin ve şeker karışımı kuru bir şekilde, pişirme sırasında pektin toplanmasını önlemek için karıştırıldı. Tartımın ardından, ilk karışım yağ banyosuna konuldu ve yağ banyosu 127.5 ° C'ye ayarlandı. Daha sonra, kuru karışım ilk hazırlanan karışıma eklenmiş ve sürekli karıştırılmıştır. Tüm karışımın sıcaklığı 109 ° C'ye ulaştığında, sitrik asit çözeltisi (% 60 a / h) ilave edildi ve karışım hemen 3x3x3 cm³ kalıplara döküldü. Yumuşak şekerler, çapraz bağların kurulması için 24 saat boyunca tutuldu.

Tablo 3. Hazırlanan şeker örneklerinin kompozisyonları

	Soya Protein İzolatı	Su	Sakkaroz	D-Psikoz
S0 SA 035	0	17	0	35
S0 SA 1025	0	17	10	25
S0 SA 2015	0	17	20	15
S0 SA 350	0	17	35	0
S1 SA 035	1	16	0	35
S1 SA 1025	1	16	10	25
S1 SA 2015	1	16	20	15
S1 SA 350	1	16	35	0

* Tüm şeker formülasyonları% 4 pektin,% 40 glikoz şurubu,% 4 Sitrik asit çözeltisi içerir

3.2.4. Kimyasal Analizler

3.2.4.1. Pektin içeren Formülasyonların Sindirim Davranışının incelenmesi

Pektinli şekerlerde diğerlerinden farklı olarak sindirim deneyleri de yapılmıştır. Sindirim deneyleri de proje önerisinde yer almayan deneylerdir. Bu alanda çalışmak isteyen bir tez öğrencisi olduğundan bu deneyler de proje deneylerine eklenmiştir. Sindirim için mide özsuyu ve ağız suyu hazırlanmıştır. Sindirim suları Bornhorst (2016)'nin makalesinde belirtildiği üzere hazırlanmıştır

3.2.5. Fiziksel Analizler

3.2.5.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) Deneyleri

Bu proje kapsamında geliştirilen şekerlemeler için camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değerleri ölçülmüştür. Ölçümler için O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki Perkin Elmer DTK 4000 cihazı kullanılmıştır. DTK deneylerinde Kırtıl ve ark'nın (2017) metodu modifiye edilerek takip edilmiştir. Analizler 0 ve 28. günler için nişasta ve jelatin içeren formülasyonlar için tekrarlanmıştır.

3.2.5.2. NMR Relaksometre Deneyleri

NMR deneyleri ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü'nde bulunan 0.5 T gücündeki Spin Track cihazı kullanılarak yapılmıştır. Jelatin ve nişasta içeren şekerlemeler için T1 ve T2 relaksasyon zamanları ölçülmüştür. T1 relaksasyon zamanı "satürasyon iyileşmesi" sekansı kullanılarak, 300 ms relaksasyon zamanı ve 400,000 us gözleme zamanı kullanılarak 4 tekrarla ölçülmüştür. T2 zamanı ise CPMG sekansı kullanılarak 40 us eko zamanı, jelatinli formülasyonlar için 2500 eko, nişasta için 600 eko, pektin içeren numuneler için 400-900 aralığında kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler nişasta ve jelatin içeren numuneler için 0,7,14 ve 21. günlerde, pektin içeren numuneler için sindirim öncesi tekrarlanmıştır.

3.2.5.3. X-Ray Difraksiyon Deneyleri (XRD)

Önerilen proje kapsamında, şekerleme ürünleri için XRD deneyleri O.D.T.Ü merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kristallenme etkisini daha iyi gözlemlemek amacıyla kontrol (sadece sükröz içeren) ve sadece D-Psikoz içeren örnekler için üretimlerini takiben 0. ve 21. Günde X-ray analizleri yapılmıştır

3.2.5.4. Tekstür Profil Analizi Deneyleri (TPA)

Deneyler için O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki Lloyd Instruments marka tekstür analizörü, Gu ve ark. (2015) tarafından kullanılan metot referans olarak alınarak kullanılmıştır. 35 mm'lik silindirik probu kullanarak, çiğnemeyi simüle etmek amacıyla 1mm/s hızda %40 kompresyon iki kere yapılmıştır. Sertlik (hardness) değerleri tüm formülasyonlar için belirlenmiştir. TPA deneyleri jelatin içeren numuneler için 0, 14 ve 21.günlerde, nişasta içeren numuneler için 0,10, 20,30. günlerde yapılmıştır.

3.2.5.5. Su aktivitesi (aw)

Hazırlanan numunelerin su aktiviteleri O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki AquaLab 4TE su aktivitesi cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5.6. Nem İçeriği (%)

Şekerleme ürünlerinin nem içerikleri O.D.T.Ü Gıda Mühendisliğinde bulunan Vakum etüvde (DAIHAN, Almanya), 70 °C de 4 saat tutularak ölçülmüştür. Yapılan denemeler sonucunda 4 saat sonunda numunelerde kütle kaybı olmadığı tespit edilmiş, 24 saat tutulmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.

3.2.5.7. Renk Ölçümü

Farklı formülasyonlarda hazırlanan şekerlemelerin renk değerlerinin belirlenmesi için O.D.T.Ü Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki Minolta marka CM-5 model renk ölçer kullanılmıştır. Şekerler hazırlandıktan sonra kırmızılık ve sarılık değerlerinin de ifade edilmesinin gerekliliğine karar verilmiştir. Bu nedenle aynı cihazla L, a, b değerleri ölçülmüş aşağıda grafiklerde verilmiştir.

3.2.6. Duyusal Analiz

SELUZ A.Ş. Duyusal Analiz deneylerinin kendi laboratuvarlarında, bu konuda uzman ekiplerinin ve eğitimli panelistlerinin yardımıyla yapılmış, şekerlemelerdeki tat, koku, ve tekstür özellikleri panelistler tarafından test edilmiştir. Panellerde hedonik ölçek kullanılmıştır ve panelistlere numuneler hakkında bilgi verilmemiş ve numuneler 3 basamaklı sayılar ile gösterilmiştir. Kalite parametrelerinin belirlenmesinin yanı sıra ürünler için genel 'tercih' ve 'kabul edilebilirlik' ile ilgili testlerin de yapılmıştır planlanmaktadır. Belirtildiği gibi bu

deneylerin tüm tasarımı ve uygulanması SELUZ A.Ş'nin uzman duyuşsal analiz ekibinin yönlendirilmeleriyle kendi laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz projenin her aşamasında yapılmış olup bu amaçla MINITAB yazılımı kullanılmıştır. Farklı kompozisyonlarda hazırlanan şekerlemelerin nem, NMR, DTK, renk, su aktivitesi ve tekstür özelliklerinin üzerinde polimerlerin, şeker tiplerinin ve depolama sürelerinin istatistiksel olarak farka sebep olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Soya Proteinin Nadir Şekerler Kullanarak Glikasyonu ve Glike Edilen Proteinlerin Fiziksel Ve Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

4.1.1. Fiziksel Analizler

4.1.1.1 NMR Relaksometre ile Glike olmuş Proteinlerin İncelenmesi

Ek 1’de detaylı verilen ANOVA sonuçları incelendiğinde, şeker tipinin, protein oranının, glikasyon tipinin ve pH’nın T2 değerleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Protein konsantrasyonu arttıkça T2 değerleri azalmış; en yüksek T2 değerleri D-psikozla glike edilen numunelerde görülmüş; püskürtmeli kurutmanın T2’yi düşürdüğü yüksek pH nın ise T2’yi arttırdığı gözlenmiştir. Glike olmuş proteinlerin T2 değerlerinin nasıl değiştiğinin literatürde relaksasyon zamanları ile inceleyen bir çalışma yoktur o neden genel NMR çalışmalarını düşünerek çıkarımlar yapılmıştır. T2 değerlerin artması sistem de serbest suyun arttığı anlamına gelmektedir (Mariette, 2010). T2 serbest olan protonların salınımları ile ilişkili olduğundan serbest su protonu olması relaksasyon zamanlarını uzatır (Ikeda ve ark. 2011; Kirtil ve Oztop, 2016). Serbest su protonun çok olması da hidrasyonun yanı su tutma kapasitesinin daha az olduğu anlamına gelmektedir. Glike edilmeden sadece su ve şeker karışımlarının da T2 değerleri ölçülmüştür ancak onlar genel deney desenine uymadığından varyans analizine dahil edilmemiştir.

T2 değeri arttıkça su tutma özelliği azaldığı için T2 sonuçları ile su tutma kapasitesi hakkında bilgi edilebileceği görülmüştür. Buna ek olarak, glikasyonun su tutma özelliğini azalttığı gözlenmiştir. Bu sayede ise T2 değerleri yüksek olan örnekler daha çok glike olmuş örnekler olarak değerlendirilebilir. Kontrol örneklerinin sonuçları incelendiğinde en düşük T2 değerlerinin bu örneklerde olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak D-Psikoz şekerinin diğer şekerlere göre glikasyonu daha iyi oranda gerçekleştirdiği söylenebilir. D-Psikozun Maillard reaksiyonlarına girme kabiliyetinin diğer şekerlere oranla daha çok olduğu bilindiğinden (Sun ve ark. 2004,2005,2006,2008) T2 değerlerinin de bunu desteklemesi proje açısından oldukça olumlu bir sonuç olmuştur. Bir çalışmaya göre, şekerlerin ortalama hidrojen bağ uzunluğunun, şekerlerin farklı hidrasyon davranışına sahip olmasının ana nedeni olduğu belirtilmiştir (Maugeri ve ark., 2017). Bu çalışmada, şeker moleküllerinin hidrasyon

davranışları ile ilişkili farklı uzunluk ve güçte H bağları oluşturduğu açıklanmıştır. Çalışmada, fruktoz ve dekstroz şekerleri karşılaştırılmış olup, fruktozun hidrojen bağ uzunluğunun dekstroza göre daha kısa olduğunu; bu nedenle, su tutma kapasitesinin de daha az olduğu sonucuna varılmıştır. Hidrasyon davranışları T2 ile incelendiğinde de fruktozlu örnekler, dekstroza göre daha yüksek T2 değerlerine sahip çıkmıştır. Böylece, T2 değerlerine bakılarak da hidrasyon davranışları gözlemlenebilir sonucuna varılmıştır. Ayrıca yapılan Pearson korelasyon analizi sonucunda, soya proteini: şeker oranı ile T2 sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4. Farklı şekerinin farklı formülasyonlarının T2 sonuçları: (pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş))

	Soya Proteini: Şeker Oranı	T2 Sonuçları (ms) [pH 7/DK]	T2 Sonuçları (ms) [pH 7/PK]	T2 Sonuçları (ms) [pH 10/DK]	T2 Sonuçları (ms) [pH 10/PK]	T2 Sonuçları (ms) [Kontrol]
Dextrose	1:01	209,572±2,369	269,233±3,545	198,057±1,569	91,192±0,888	162,865±1,223
	2:01	210,095±1,805	177,543±2,431	134,204±3,443	64,339±0,0912	108,432±0,884
	3:01	156,347±3,936	158,581±2,147	142,040±1,348	59,548±0,864	86,664±0,824
	5:01	120,517±2,631	113,043±1,649	120,650±2,466	51,019±0,369	77,017±0,442
	10:01	92,345±2,288	96,729±1,044	125,744±2,224	43,442±0,486	73,103±0,322
Fructose	1:01	386,743±3,489	264,622±2,889	439,090±3,664	196,633±1,042	137,95±1,007
	2:01	250,473±3,201	153,145±0,987	265,006±2,888	113,285±0,906	112,985±0,732
	3:01	224,647±2,756	123,146±1,126	276,011±2,663	92,046±0,882	103,120±0,665
	5:01	174,935±2,109	108,653±1,423	213,621±2,669	87,188±0,712	79,623±0,406
	10:01	173,695±1,988	97,466±0,902	133,448±1,442	77,439±0,624	81,237±0,342
D-Psicose	1:01	351,128±4,757	428,329±2,487	418,093±3,882	212,845±1,112	136,291±0,864
	2:01	254,921±2,887	208,711±2,105	435,268±4,102	126,042±0,554	99,100±0,685
	3:01	246,756±3,212	133,614±1,481	271,481±2,987	97,459±0,356	84,672±0,452
	5:01	244,289±1,786	118,691±1,413	255,767±2,144	92,255±0,408	75,221±0,268
	10:01	122,646±1,654	131,341±1,324	159,118±1,756	80,228±0,413	72,621±0,216

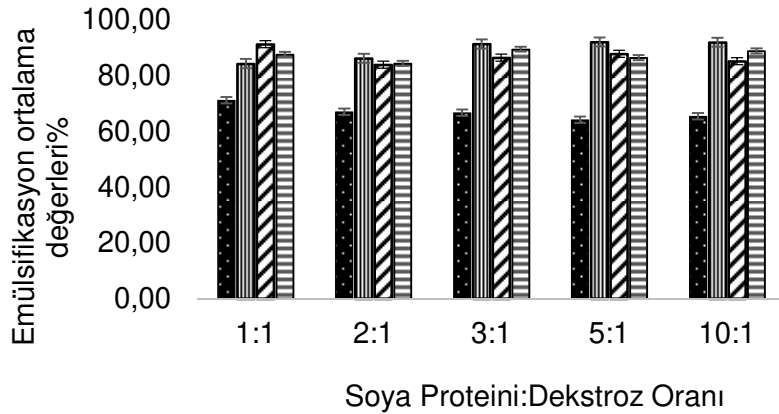
Elde edilen ANOVA sonuçlarına bakıldığında, genel bir karşılaştırma olarak, protein: şeker oranı arttıkça serbest amino grubu miktarı artmış ve dizi yavaş yavaş 1: 1, 2: 1, 3: 1, 5: 1'e yükselmiştir. ve 10: 1. Bunun nedeni, oran arttıkça artan numunelerdeki protein miktarıdır. Şeker tipleri birbirleriyle karşılaştırıldığında, en yüksek amino grupları dekstroz, ardından D-psicose ve fruktoz gözlenmiştir. Bu sonuçlardan en düşük glikasyonun, D-Psicose ve fruktoz ile karşılaştırıldığında beklendiği gibi şeker dekstrozuyla gerçekleştiği söylenebilir. pH

tamponlarının etkileri karşılaştırıldığında, pH 7 numunelerinde glikasyonun en çok gözlemlendiği görülmüştür.

4.1.1.2. Emülsifikasyon Aktivitesi Deneyi

Emülsiyonların oluşumunu, stabilitesini ve aktivitesini birçok kimyasal ve fiziksel faktörün etkilediği bilinmektedir. Bu faktörlerin bazıları, protein tipi ve konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve iyon gücüdür. Ek olarak, küresel proteinlerin emülsiyonlaştırma davranışı, proteinlerin çözünürlüğünden, yüzey hidrofobikliğinden ve moleküler esnekliğinden etkilenir (Combrinck, Otto ve Plessis, 2014).

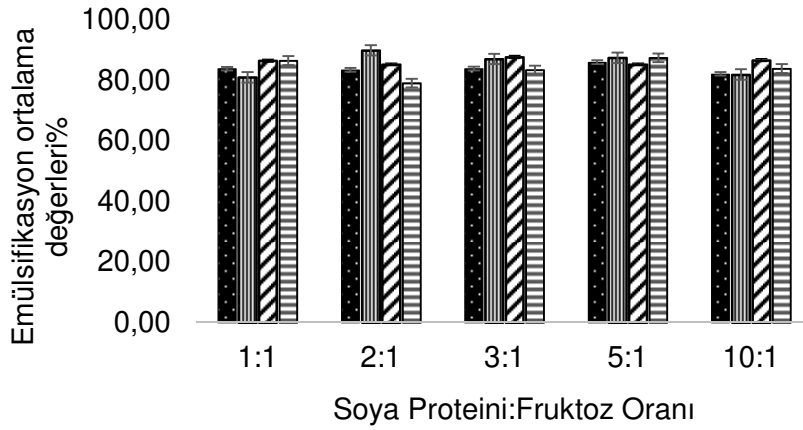
Şekil 1'de, şeker olarak kullanılan dekstroz örneklerinin anlık emülsiyon aktivitesi ölçülmüştür. Şekile göre, pH 7 / Dondurarak Kurutulmuş örnekler en az emülsiyon aktivitesi göstermiştir. Ayrıca, bu örneklerde, soya proteininin şekere oranının, emülsiyon aktivitesini etkilemediği gözlenmiştir ($p>0,05$). Bir başka deyişle %66,67 ile %72,72 arası değişen benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer taraftan, pH'ın etkisi göz önüne alındığında, pH 10'lu tamponla hazırlanan dondurarak kurutulmuş numunelerin pH 7'den daha yüksek emülsiyon aktivitesi gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 1. Dekstroz şekerinin farklı formülasyonlarının emülsifikasyon değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

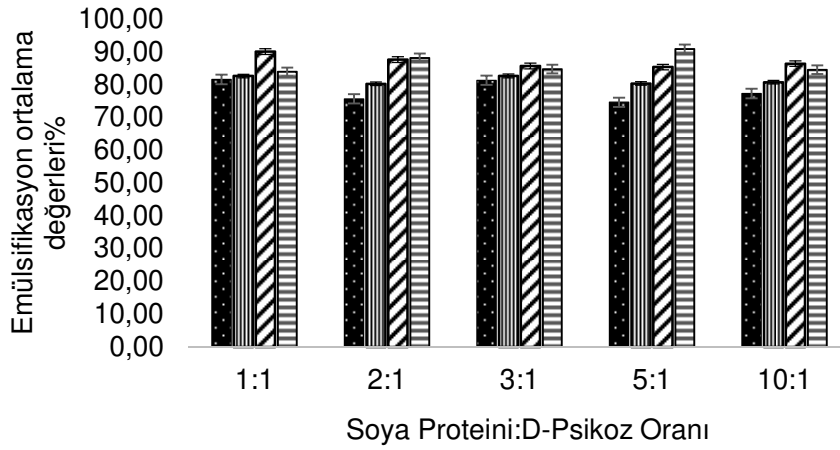
Şekil 2'de, fruktoz sonuçlarının anlık emülsiyon aktivitesi gösterilmiştir. Fruktoz örneklerinde, en yüksek aktivite kombinasyonu, 2: 1 (soya proteini: şeker oranı) pH 10 / Dondurularak Kurutulmuş örnekte %89,83 olarak gözlemlenmiştir. Farklı varyasyonlardan dekstroz

aralıkları dışında, fruktoz örneklerinde de tüm kombinasyonların aktiviteleri birbirine çok yakın olduğu gözlemlenmiş olup %79,19 ile %89,83 arasında değiştiği görülebilir. Bu nedenle, glikasyona uğramış fruktoz numunelerinin, dondurarak kurutucu veya püskürtmeli kurutucu ile meydana gelen glikasyonun birbirine yakın emülsiyon aktiviteleri gösterdiği sonucuna varılabilir.



Şekil 2. Fruktoz şekerinin farklı formülasyonlarının emülsifikasyon değerleri: ■ pH 7 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▪ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

Şekil 3'te şeker bileşeni olarak D-Psikoz ile hazırlanan örneklerin anlık emülsiyon aktivitesi incelenmiştir. Bu deneyde, pH 7 / Dondurularak Kurutulmuş numuneler diğer formülasyonlara kıyasla biraz daha düşük emülsiyon aktivitesi göstermiş bu da pH'ın emülsiyon aktivitesi üzerinde bir etkisi olduğunu göstermektedir. D-Psikoz şekerinin soya proteini ile glikasyonu sonucu oluşan yapısının da emülsiyon aktivitesini üzerinde dikkate değer bir şekilde etkisi olduğu tespit edilmiştir.



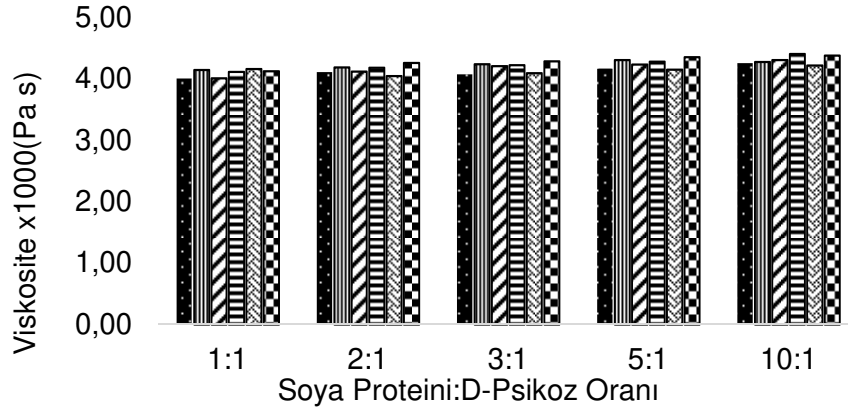
Şekil 3. D-Psikoz şekerinin farklı formülasyonlarının emülsifikasyon değerleri: ■ pH 7 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

Ek 2'deki ANOVA Sonuçları incelendiğinde, dekstroz ve psikozun benzer ($p>0,05$), fruktozun daha yüksek; protein şeker oranının ise çok fazla etki yapmadığı görülmüştür. Psikozun yüksek glikasyon oranına rağmen emülsifikasyon aktivitesinin çok yükseltmemesi hidrasyonu azaltma özelliği ile ilişkilendirilebilir (Matsuo ve ark., 2003). Serbest suyun fazla olmasının emülsifikasyon aktivitesini olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür. Püskürtmeli kurutmalı numunelerde emülsifikasyon aktivitesinin daha yüksek olması, bu metotla proteinlerde oluşan denatürasyon ve denatürasyon sonucu yağ damlacıklarına daha iyi yapışabilme durumu ile açıklanabilir (İbanoglu & Erçelebi, 2007).

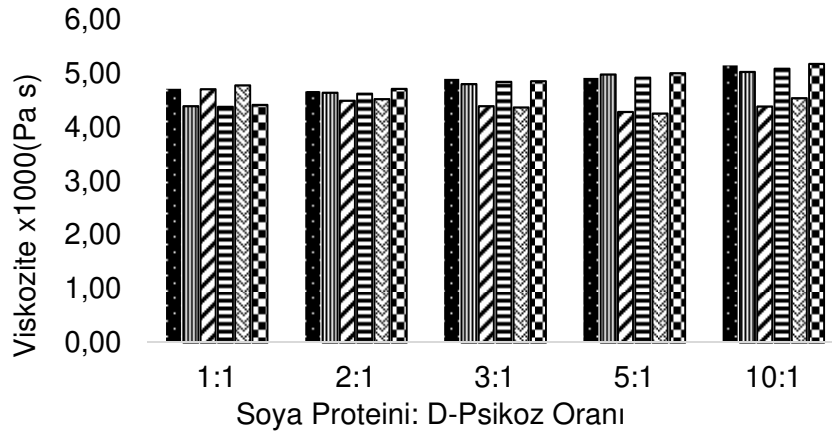
4.1.1.3. Glike Olmuş Protein Çözeltilerinin Viskozite Ölçümü

Hazırlanan çözeltilerin tümü, Newton akışkan davranışı gösterdiği için elde edilen verilere Newton modeli uygulanarak viskozite değerleri bulunmuş ve veriler MINITAB yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Şeker tipi, protein-şeker oranı, pH ve glikasyon tipi olmak üzere dört farklı değişken kullanılarak çoklu varyans analizi yapılmıştır. İstatiksel sonuçlar detaylı bir şekilde Ek 3 de verilmiştir. Bu deneylerde püskürtme yöntemi ile kurutma ve kurutma işleminin uygulanmadığı örneklerle çalışılmıştır. Dondurarak kurutma ile elde edilen numune sayısı az miktar olduğundan, reometre ile deney yapılacak kadar numune elde etmesi oldukça zor olmuştur bu nedenle bu deneyler sadece püskürtmeli kurutma ve glike olmayan numuneler için yapılmıştır. İstatiksel olarak, farklı değişkenler arasında anlamlı bir fark olup

olmadığını kontrol etmek için Tukey testi uygulanmıştır. Sonuçlara göre etkisi incelenen faktörlerin viskozite üzerinde önemli etkisi olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 4. Soya Protein-şeker ve kontrol solüsyonlarının pH 7 de viskozite değerleri ■ Protein-Dekstroz, ▨ Kontrol Protein-Dekstroz, ▩ Protein-Fruktoz, ▪ Kontrol Protein-Fruktoz, ▫ Protein- Psikoz, ▬ Kontrol Protein-D-Psikoz



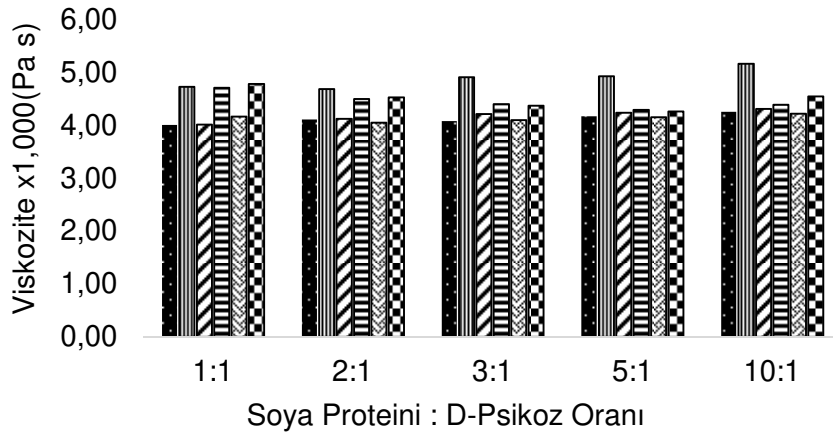
Şekil 5. Soya Protein-şeker ve kontrol solüsyonlarının pH 10 da viskozite değerleri ■ Protein-Dekstroz, ▨ Kontrol Protein-Dekstroz, ▩ Protein-Fruktoz, ▪ Kontrol Protein-Fruktoz, ▫ Protein- Psikoz, ▬ Kontrol Protein-D-Psikoz

pH 10'daki çözeltiler, pH 7'deki solüsyonlara kıyasla daha yüksek bir viskozite göstermiştir. pH 10'daki çözeltilerin kalın bir görünüme sahip olması da daha yüksek çözünürlük sergilediğini belirtmektedir. pH 10'da glikasyonun daha fazla olması Maillard reaksiyonlarının alkali ortamdaki yüksek hızı ile ilgilidir. Bu da glikasyonun viskoziteyi artırdığının

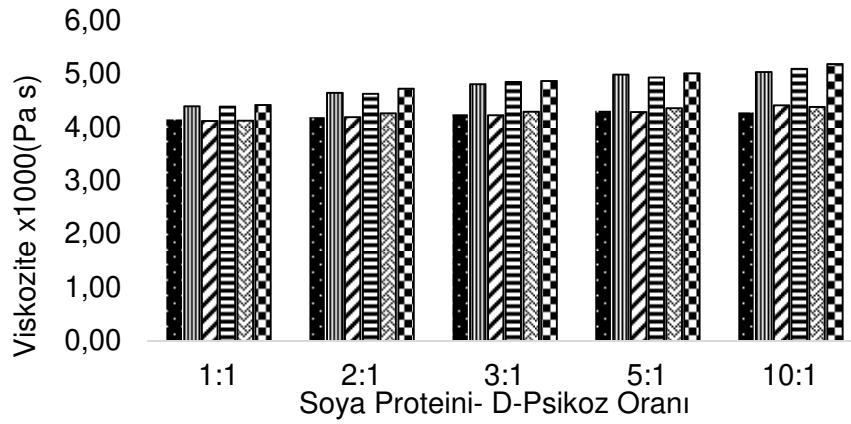
göstergesidir. Fruktoz ve D-Psikoz ile glike edilmiş proteinler kullanılarak hazırlanan çözeltiler, kontrol numunelerine kıyasla daha düşük bir viskozite gösterirken, dekstroz ile glike edilmiş proteinler, glike olmayan proteinlere göre önemli bir farklılık göstermemiştir.

Bununla birlikte, sadece glike olmuş proteinler (kontrol numuneleri hariç) karşılaştırıldığında, pH 7'deki dekstroz örneklerinin, pH 10'a kıyasla önemli ölçüde daha düşük bir viskoziteye sahip olduğu görülmüştür.

Diğer taraftan, glikasyona maruz bırakılmamış numunelerin (Kontrol numunelerinin) viskozitelerinin daha yüksek bulunması da bu karışımdaki şekerin serbest halde bulunan suyu daha fazla bağlaması ve proteinin çözünebileceği su miktarını azaltması ile açıklanabilmektedir (Amin ve ark., 2014).



Şekil 6. Soya Protein-şeker solüsyonlarının pH 7 ve pH 10'daki viskozite değerleri ■ pH 7 Protein-Dekstroz, ▨ pH 10 Protein-Dekstroz, ▩ pH 7 Protein-Fruktoz, ▨ pH 10 Protein-Fruktoz, ▩ pH 7 Protein- Psikoz, ▨ pH 10 Protein-D-Psikoz



Şekil 7. Soya Protein-şeker kontrol solüsyonlarının pH 7 ve pH 10'daki viskozite değerleri ■ pH 7 Protein-Dekstroz, ▨ pH 10 Protein-Dekstroz, ▩ pH 7 Protein-Fruktoz, ▤ pH 10 Protein-Fruktoz, ▥ pH 7 Protein-Psikoz, ▦ pH 10 Protein-D-Psikoz

Protein-şeker oranı göz önüne alındığında, protein-şeker oranı ne kadar yüksekse, viskozite o kadar yüksek çıkmıştır. Protein gibi makromoleküllerin konsantrasyonun artmasının viskoziteyi arttırması beklenmektedir. Elde edilen sonuç literatür ile uyumludur. Bununla birlikte, kontrol numuneleri hariç tutulduğunda, 1: 1 protein-şeker oranlı glike proteinler ile hazırlanan çözeltilerin, 5: 1, 3: 1 ve 2: 1'e kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir viskoziteye sahip olduğu bulunmuştur.

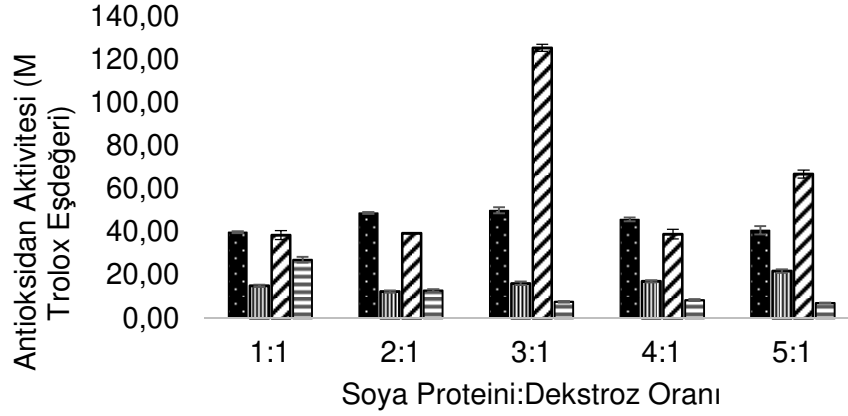
Sadece kontrol solüsyonları karşılaştırıldığında, pH 7'deki numunelerin pH 10'daki numunelere göre daha düşük bir viskoziteye sahip olduğu görülmüştür. pH 10 çözeltileri için bakıldığında ise, viskozite, protein-şeker oranı arttıkça daha fazla artmıştır. Bu da soya proteininin alkali ortamda daha yüksek oranda çözünmesi ile açıklanabilir (Hua ve ark. 2003).

4.1.2. Kimyasal Analizler

4.1.2.1. Glike olmuş Proteinlerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi :CUPRAC Metodu

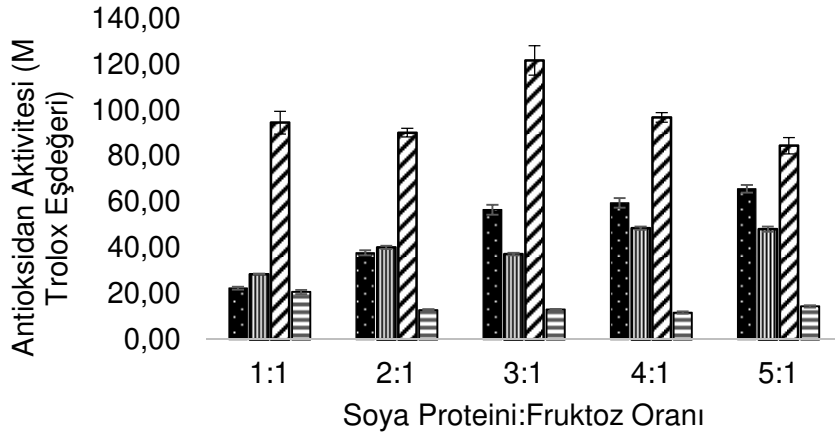
pH 7 de glike olmuş örneklerin aktivitesi pH 10 örneklerinin aktivitelerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Dondurularak kurutulan örnekler püskürtülerek kurutulan örneklerle göre daha fazla antioksidan aktivitesi göstermiştir. Yüksek alkalitenin antioksidan aktiviteyi olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Varyans analizi sonuçlarına göre antioksidan aktivite pH 10'da yaklaşık %50 azalmıştır. Bu metodun yüksek pH da iyi çalışmama ihtimali de mevcuttur.

Nitekim literatürdeki çalışmaların çoğu asitliği yüksek gıdalarda yapılmıştır. Bu hipotezin doğrulanması için standard bir fenolik maddenin düşük ve yüksek pH da aktivite deneyinin yapılması planlanmıştır.



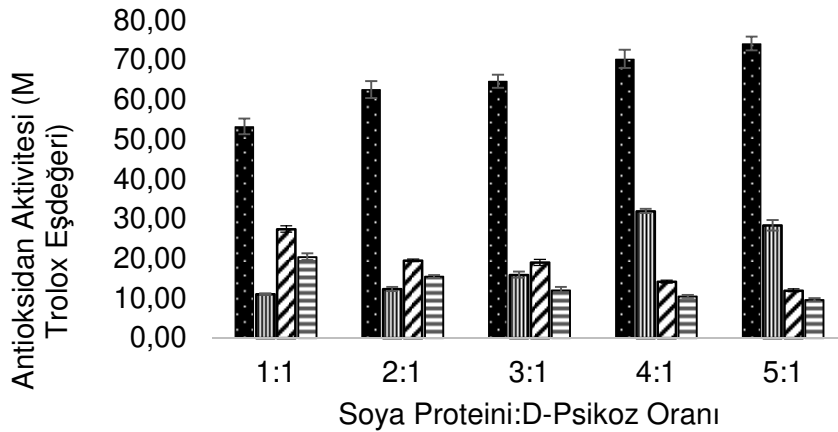
Şekil 8. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▪ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

Fruktoz ile glike olmuş soy proteinlerinin antioksidan aktiviteleri Şekil 9'da gösterildiği üzere soya proteini: şeker oranı arttıkça artış göstermiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi 3:1 örneklerinde gözlemlenmiştir. Bu konsantrasyonun antioksidan aktivite açısından oluşan Maillard reaksiyonu ürünleri yönünden uygun olduğu görüşüne varılmıştır. pH 7 de glike olmuş örneklerin aktivitesi pH 10 örneklerinin aktivitelerine kıyasla daha yüksek elde edilmiştir. Dondurularak kurutulan örnekler püskürtülerek kurutulan örneklere göre daha fazla antioksidan aktivitesi göstermiştir. Buradan, püskürtme ile kurutma ile de antioksidan özellik gösteren maddelerin sıcaklıktan ciddi oranda etkilendiği sonucu çıkmıştır.



Şekil 9. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Puskurtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Puskurtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▪ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

D-psikoz ile glike olmuş soy proteinlerinin antioksidan aktiviteleri Şekil 10'da gösterildiği üzere soya proteini: şeker oranı arttıkça dramatik bir değişiklik göstermemiştir fakat puskürtülerek kurutulmuş pH 7 örneklerinde diğer örneklere göre çok yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Dondurularak kurutulan örnekler ve puskürtülerek kurutulan örnekler arasında da önemli bir fark gözlemlenmemiştir.



Şekil 10. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Puskurtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Puskurtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▪ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

Farklı şekerlerle hazırlanmış glike proteinlerin antioksidan aktiviteleri birbirleriyle kıyaslandığında, en yüksek aktivite fruktoz örneklerinde elde edilmiştir ve bu sırayı dekstroz ve D-psikoz örnekleri takip etmiştir. Fruktozun bir ketoz olan D-Psikozdan yaklaşık %50 fazla aktivite göstermesi beklenmedik bir sonuçtur. D-Psikozun en önemli avantajlarından birinin glikasyonu arttırmakla beraber antioksidan aktivitesi yüksek Maillard ürünleri oluşturduğudur (Zeng, Zhang, Guan, Zhang, & Sun, 2013). Bu hipotez bu deney sonuçları ile ters düşmektedir. En yüksek glikasyonun D-Psikoz ve alkali ortamda görülmesi ve bu metodun alkali ortamdan etkilene ihtimali sonuçların nedenini açıklayabilir. Literatürdeki çalışmaların çoğunun, CUPRAC metodunun; askorbik asit, reçel ve marmelat, içecek gibi içecekler gibi yüksek asitli gıdalarda yapıldığı görülmüştür (Kamiloglu ve diğerleri, 2015; Gregg, Righetti, Buchli Ve Schaal, 2010). Bu sebeple, pH arttıkça antioksidan aktivitenin düştüğü CUPRAC metodu için söylenebilir. Nitekim bundan sonraki bölümde tartışılacak olan DPPH sonuçlarında da görüleceği üzere en yüksek antioksidan aktivite D-Psikozla elde edilen numunelerde görülmüştür.

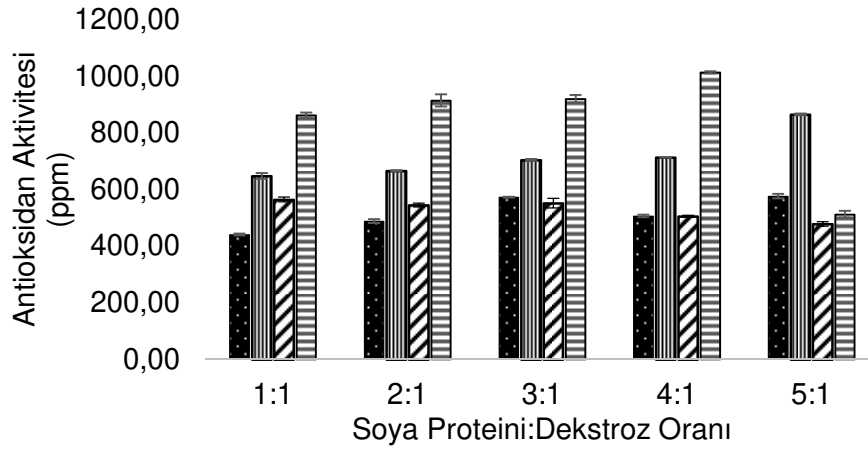
4.1.2.2. Glike olmuş proteinlerin antioksidan aktivitelerinin Belirlenmesi: DPPH Metodu

Dekstroz ile glike olmuş soy proteinlerinin antioksidan aktiviteleri Şekil 11'de gösterildiği üzere soya proteini: şeker oranı arttıkça artış göstermiştir. Fakat 10:1 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. En yüksek aktiviteden en düşüğe doğru sıralandığında 5:1, 3:1, 2:1, 10:1 ve 1:1 şeklinde bir sıralama elde edilmiştir. pH 7 de glike olmuş örneklerin aktivitesi pH 10 örneklerinin aktivitelerine kıyasla daha düşüktür. Dondurularak kurutulan örnekler püskürtülerek kurutulan örneklere göre daha fazla antioksidan aktivitesi göstermiştir.

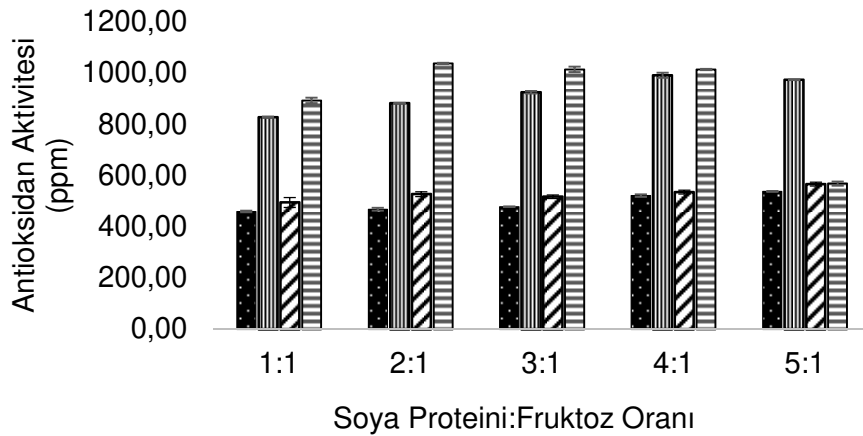
Fruktoz ile glike olmuş soy proteinlerinin antioksidan aktiviteleri Şekil 12'de gösterildiği üzere soya proteini: şeker oranı arttıkça artış göstermiştir. Fakat 10:1 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. pH 7 de glike olmuş örneklerin aktivitesi pH 10 örneklerinin aktivitelerine kıyasla fark edilebilir bir düşüş göstermiştir. Dondurularak kurutulan örnekler püskürtülerek kurutulan örneklere göre daha fazla antioksidan aktivitesi göstermiştir.

Dekstroz ve fruktoz için elde edilen sonuç D-psikoz örnekleri içinde geçerlidir fakat pH 10 değerlerinde bir düşüş gözlemlenmemiştir (Şekil 13). Oran arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı ve pH 10 örneklerinin aktivitesinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Dondurularak kurutulan örnekler püskürtülerek kurutulan örneklere göre daha fazla antioksidan aktivitesi göstermiştir.

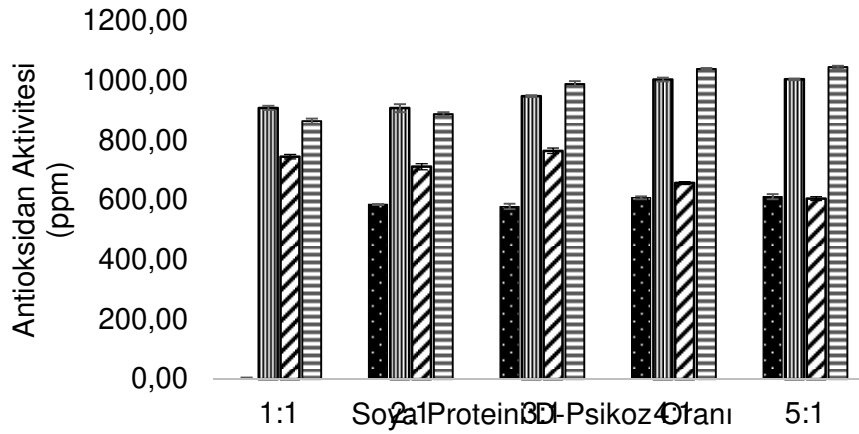
Farklı şekerlerle hazırlanmış glike proteinlerin antioksidan aktiviteleri birbirleriyle kıyaslandığında, en yüksek aktivite D-psikoz örneklerinde elde edilmiştir ve bu sırayı fruktoz ve dekstroz örnekleri takip etmiştir. Oranlar sıralandığında 5:1, 3:1, 2:1, 10:1 ve 1:1 şeklinde bir sıralama elde edilmiştir. pH 10 örneklerinin antioksidan aktivitesi pH 7 örneklerine göre daha iyi bir sonuç vermiştir ve dondurularak kurutma işleminin antioksidan aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 11. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)



Şekil 12. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri: ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▤ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)



Şekil 13. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin antioksidan aktivitesi değerleri : ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK(Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

CUPRAC metodunun aksine, beklendiği üzere en yüksek antioksidan aktivitenin D-Psikoz ile hazırlan numunelerde olduğu görülmüştür. Protein miktarı ile doğru orantılı bir artış bulunmamıştır. Ancak protein şeker oranının aktivite üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Alkali pH ve dondurarak kurutmanın daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip glike proteinler oluşturduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, çay infüzyonunun daha az asidik ortamlarda daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bir çalışmanın sonuçları ile tutarlı olmuştur (Pekal ve Pyrzyńska, 2015). Ayrıca alkali pH'ın, DPPH metodunu kullanılarak antioksidan aktivitesini arttırdığı sonucuna da varılmıştır. Aslında, radikal süpürme sürecinin ve dolayısıyla hidrojen iyonu konsantrasyonunun pH değeriyle değişiklik gösterdiği düşüncesi Dawidowicz & Olszowy (2014) tarafından açıklanmıştır. Bu nedenle, pH , DPPH testinde elde edilen sonuçlar üzerinde büyük etkiye sahiptir. Araştırmalara göre, glike olmuş D-Psikoz diğer indirgeyici şekerlere sahip glike olmuş proteinlerden daha yüksek bir serbest radikal süpürme ve antioksidan aktivite özelliği göstermektedir (Sun vd., 2004a). Buna ek olarak, D-Psikoz, yüksek seviyede radikal süpürücü olma yeteneğine sahiptir (Sun, Hayakawa, Ogawa ve Izumori, 2007). Bu nedenle, D-Psikoz'un fruktoz ve dekstroza şekerlerine kıyasla en yüksek antioksidan aktivitesine sahip olması beklenmiştir ve sonuçlar da bu yönde elde edilmiştir.

4.1.2.3. Glike olmuş Proteinlerin Serbest Amino gruplarının: OPA Metodu

Şekil 14-16 incelendiğinde protein: şeker oranı arttıkça serbest amino grup miktarının da arttığı gözlemlenmiştir. Protein miktarı arttıkça serbest amino grubunun artması beklenen bir sonuçtur. Elde edilen veriler, seçilen protein şeker oranlarında kullanılan şeker miktarının limitleyici faktör olduğunu göstermiştir. Şeker miktarını sabit tutup protein miktarını artırarak belirli bir şeker konsantrasyonuna karşılık gelen glike olacak protein miktarını tespit etmek mümkün olabilir. Ancak soya proteini çözünürlük açısından sıkıntılı bir protein olduğundan bu denemelerle yapılan çalışmalarda beklenen sonuçları vermemiştir. Bu nedenle literatürdeki çalışmalarda olduğu gibi şeker protein oranı bir faktör olarak seçilmiştir.

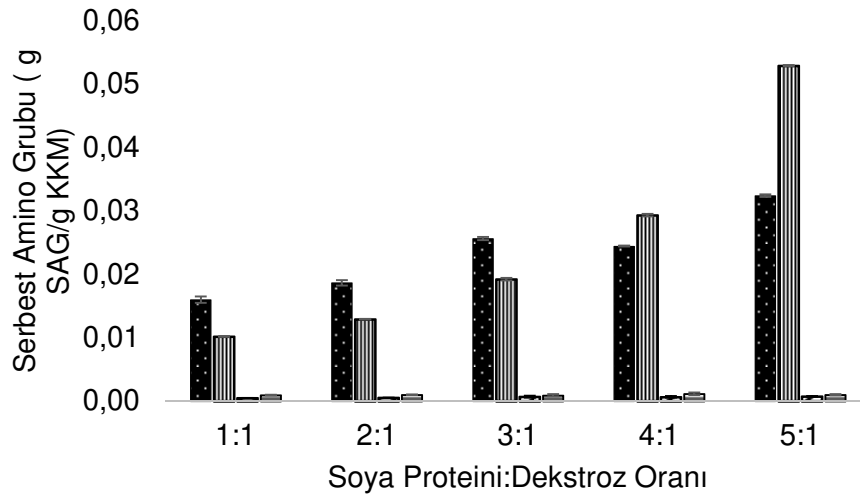
Genel bir karşılaştırma yapıldığında serbest amino grup miktarı protein: şeker oranı arttıkça artış göstermiştir ve sıralama artan bir şekilde '1:1, 2:1, 3:1, 5:1 ve 10:1' olacak şekilde elde edilmiştir. Sıralamanın böyle olmasının nedeni oran arttıkça örneklerdeki protein miktarının artmasıdır. Şeker türleri birbirleriyle kıyaslandığında ise en fazla amino grubu dekstroзда gözlemlenmiş ve bu sırayı D-psikoz ve fruktoz takip etmiştir. Böylelikle, dekstroзда en az glikasyonun olduğu söylenilebilir. pH örnekleri kıyaslandığında ise en çok glikasyon pH 7 örneklerinde ve dondurularak kurutulan örneklerde gözlemlenmiştir.

Serbest amino grup miktarı farklı pH değerlerinde de etkisini göstermiştir. Sadece glikasyon açısından yaklaşıldığında, amino grubunun fazla olması glikasyonun daha az olduğunu göstermektedir. Ancak burada belirtilmesi gereken önemli bir nokta, ANOVA sonuçlarına göre pH 10 da amino gruplarının yüksek çıkmasının direk glikasyonun az olduğu şeklinde yorumlanmaması gerekliliğidir. Yine ANOVA sonuçlarından görüleceği üzere püskürtmeli kurutma ile dondurarak kurutma arasında ciddi bir fark vardır. Püskürtmeli kurutma, glikasyona girmemiş amino gruplarının denatürasyon sonucu açığa çıkmasına sebep olmuş; pH 10 da çözünürlüğü arttırdığından bu koşulda elde edilen proteinlerin serbest amino grubu daha fazladır. Özetle sadece serbest amino grubu değerlerine bakılarak glikasyon derecesi hakkında net ve kesin yorumlar yapılamayacağı anlaşılmıştır.

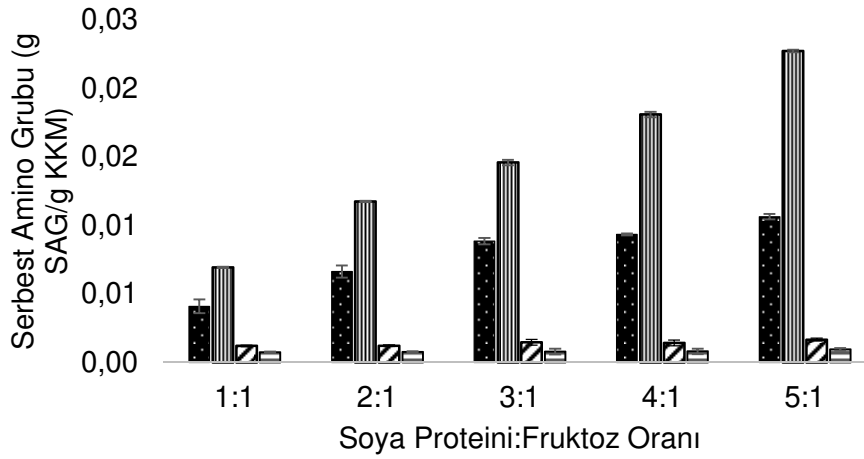
Bununla birlikte, ANOVA sonuçlarına göre, pH 10'da elde edilen daha yüksek sonuçların bu pH'ta daha az glikasyon meydana geldiğine yorumlanmaması gerektiğine dikkat etmek önemlidir. Bu noktada, Lowry Metodunda elde edilen sonuçlar da dikkate alınmalıdır. Hatırlanabileceği gibi, pH 10 tamponlu numuneler, pH 7 tamponlu olanlara kıyasla daha düşük toplam protein çözünürlüğü göstermiştir. Ayrıca, OPA sonuçlarında, serbest amino

grupları, pH 7 olanlara kıyasla pH 10 tamponlu numunelerde daha yüksektir. Bunun nedeni, pH 10'da soya proteininin denatürasyonu ile açıklanabilir. Denatürasyonla, glikasyona katılmayan ve çözeltide kalmış olabilecek bazı serbest amino grupları pH 7'de daha yüksek sonuçlar elde edilmesinin nedeni olarak gösterilebilir (Diab et al., 2009).

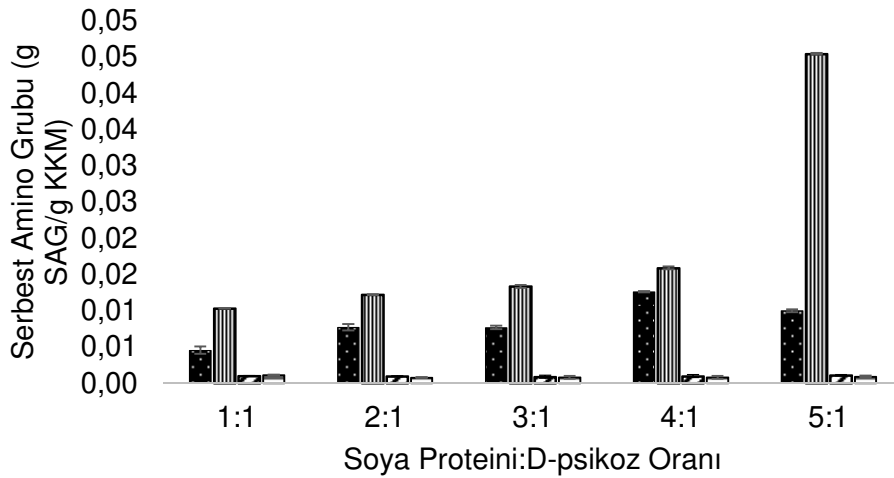
Özetle, OPA ve Lowry sonuçları karşılaştırıldığında sonuçların birbirlerine uyduğu bulunmuştur. Bu nedenle, glikasyon için en uygun pH değerinin pH 7 olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 14. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glikasyon örneklerinin serbest amino grup miktarları (g SAG (Serbest Amino Grubu) / g KKM (Kuru Katı Miktarı)) : ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▤ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▥ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)



Şekil 15. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin serbest amino grup miktarları (g SAG (Serbest Amino Grubu) / g KKM (Kuru Katı Miktarı): ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▪ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş))

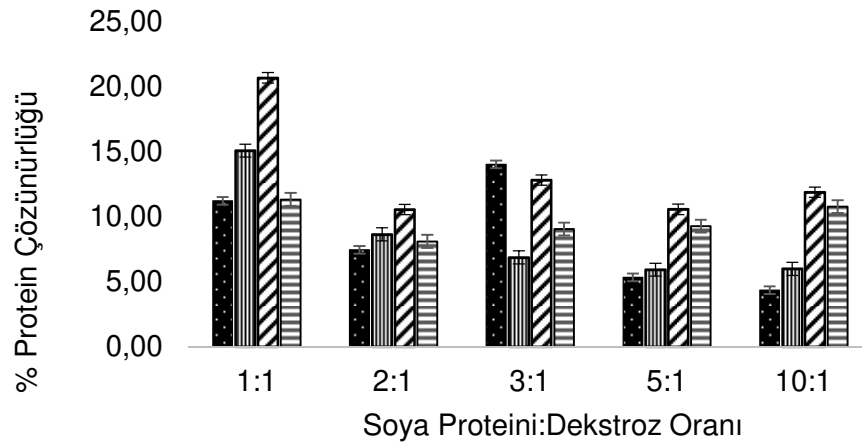


Şekil 16. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin serbest amino grup miktarları (g SAG (Serbest Amino Grubu) / g KKM (Kuru Katı Miktarı): ■ pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▨ pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), ▩ pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), ▪ pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş))

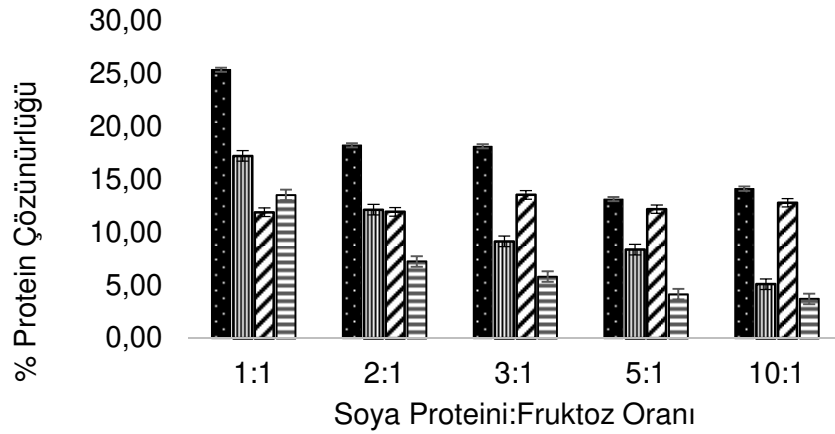
4.1.2.4. Lowry Yöntemi ile Çözünürlük Tayini

Öncelikle metot için gerekli reaktifler hazırlanmıştır. Reaktif 1, %2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilave edilerek distile suda içinde hazırlanmış, Reaktif 2, % 2 Na-K Tartarat ilavesiyle distile suda hazırlanmıştır. Reaktif 2'nin hazırlanmasının nedeni, alkali ortamda Cu^{+2} oluşumunu önlemektir. Reaktif A, 0.1 N NaOH içerisinde % 2 Na_2CO_3 ile hazırlanmıştır. Lowry ACR reaktifini hazırlamak için Reaktif A, Reaktif 2 ve Reaktif 1 sırasıyla 100: 1: 1 oranlarında karıştırılmıştır. Folin-Fenol Reaktif hazırlanışı için sırasıyla: 2N stoku 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmış, hazırlanan reaktiflerden sonra, kalibrasyon eğrisi BSA (Bovine Serum Albumin) stok çözeltisi ile 1 mg / ml ile başlanıp 0.03125 mg / ml' ye kadar seri seyreltmeler ile yapılmıştır. Daha sonra deney, pH 7 ve pH 10 tamponları ile %1'lik örnek-tampon solüsyonları (w / v) olacak şekilde hazırlanan glike olmuş proteinlere uygulanmıştır.

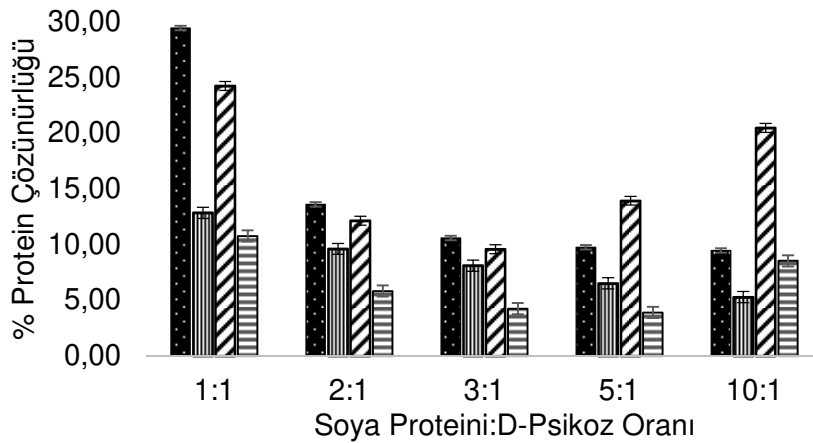
Kontrol örneği, tüpe 0.5 ml distile su ilave edilerek hazırlanmış, daha sonra 2.5 ml Lowry ACR reaktifi ilave edilmiştir. Son olarak, 0.25 ml Folin Reaktifi eklenmiştir. Glike olmuş numuneler için, tüplere 0.5 ml distile suyun eklenmesi yerine, 0.5 ml %1 numune-tampon solüsyonu (w / v) eklenerek tüpler 8 saniye boyunca vortekslenmiştir. Daha sonra, tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş, absorbans değerleri sırasıyla 680 nm ve 750 nm'de olacak şekilde okunmuştur. En sonunda, absorbans değerlerinin sonuçları kalibrasyon eğrisine konulup okunmuştur. Çoklu varyans analizi sonuçları Ek 7 de verilmiştir. Sonuçlar 17-19 no'lu şekillerde gösterilmiştir.



Şekil 17. Dekstroz şekerinin farklı formülasyonlarının Lowry yöntemi ile çözünürlük tayini: ■ pH 7 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK(Dondurularak kurutulmuş), ▩pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)



Şekil 18. Fruktöz şekerinin farklı formülasyonlarının Lowry yöntemi ile çözünürlük tayini: ■ pH 7 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK(Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)



Şekil 19. D-Psikoz şekerinin farklı formülasyonlarının Lowry yöntemi ile çözünürlük tayini: ■ pH 7 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

Tüm örnekler için, genel istatistiksel analiz yapılmış ve Ek'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Şeker tipi sonuçlarına göre, çözünürlük fruktozda en yüksektir ve ardından D-Psicose ve dekstroz takip etmiştir. Soya proteininin şeker oranlarına bakıldığında, 1: 1 oranına sahip örnekler diğer oranlardan daha fazla çözünmüş ve oran arttıkça çözünürlük azalmıştır.

Lowry yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre protein çözünürlükleri düşük pH da daha yüksek çıkmıştır (EK 7: pH 7 > pH 10) . Proteinler koyuldukları çözeltilerde tampon özellikler

gösterebilir. Bu bağlamda, soya proteininin tampon etkisi de dikkate alınmalıdır. Örneğin, soya proteininin izoelektrik noktası yaklaşık 4.5'tür ve bu pH değerlerinde, soya proteini çözünmek yerine topaklaşır (Hefnawy ve Ramadan, 2011). Bu pH civarında soya proteini açılmaz, bu nedenle proteinin çözünürlüğü en düşük seviyededir (Hefnawy ve Ramadan, 2011). Yapılan bir çalışmada, soya proteini izolat filmleri 2, 8 ve 11 pH değerlerinde incelenmiştir ve uç pH değerlerinin (2'nin altında ve 11'in üzerinde) protein yapısını bozduğu belirtilmiştir. Çözeltinin son pH'ı, soya proteininin tampon etkisinden dolayı farklı olacaktır. Çalışmanın sonuçları, en yüksek çözünürlüğün 8 pH değerinde gözlemlendiğini göstermiştir. Çalışmada, pH 11 numunesinin neden pH 8'den daha düşük bir çözünürlüğe sahip olduğunu göstermiş, pH 11'de, çözünmeyen maddelerin açığa çıkması ile birlikte bu çözünmeyen bileşiklerin, proteinin çözünürlüğünde bir azalmaya neden olduğu sonucuna varılmıştır (Veliyulin, Mastikhin, Marble, & Balcom, 2008).

Sonuç olarak, literatürde Lowry Metodu üzerindeki pH etkisi hakkında birçok bilgi bulunmaktadır. Özel proteinlerin, proteinin toplam çözünürlüğünü belirlerken farklı pH gerektiren karakteristik davranışlara sahip oldukları söylenebilir. Her ne kadar, glikasyon ile pH 10'da çözünürlükte bir artış beklenmiş olsa da, soya proteini, karakteristik davranışı nedeniyle bu eğilimi göstermedi. Bununla birlikte, daha fazla gliksasyona uğramış olsa da, çözünürlüğünde bir düşüşe neden olmuş olabilir. Bu durumda, glike olmuş soya proteinler için daha yüksek çözünürlüğe sahip olmak için pH 7'nin pH 10'dan daha iyi bir seçim olacağı bu deney sonucuna bakılarak söylenebilir.

4.1.2.5. İndirgen Şeker Miktarı Tayini

Glikasyon oldukça bağlanan şeker miktarı artacağından DNS sonuçlarının bağlanma oranı ile ilgili bilgi vereceği düşünülmüştür. Sonuçlar Tablo 5, 6 ve 7'de gösterilmiştir. Çoklu Varyans Analizi sonuçları da Ek 8 de verilmiştir.

Maillard reaksiyonu sonucu oluşan bazı ürünleri de indirgenme potansiyeli gösterdiğinden sonuçlarda beklenmeyen yükselmeler olmuştur (Tablo 5). Bu çelişkili değerlerin olmasının bazı nedenleri vardır. Bunlardan biri, glikasyondan sonra, Maillard reaksiyonu tarafından üretilen renge katkıda bulunan yeni oluşan bileşiklerin, DNS reaktifi ile reaksiyona girme potansiyeline sahip olması gösterebilir. Genel olarak, DNS metodu bir mol şekerin bir mol 3,5-dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girmesini temel alır. Bununla birlikte, birçok yan reaksiyon olduğu ve gerçek reaksiyon stokiometrisinin daha karmaşık olduğu

düşünülmektedir. Bu bakımdan, yan reaksiyon tipi, indirgen şekerlerin doğasından etkilenir (Miller, 1959). Farklı indirgeyici şekerler genellikle farklı renk yoğunlukları verir (Hide & Horrocks, 1994).

DNS yöntemi literatür üzerinde daha fazla araştırıldığında, farklı çalışmalarda bu yöntemle ilgili çeşitli problemlerin yaşandığı görülmüştür. Aslında, yöntemle elde edilen sonuçların NS (Nelson-Somogyi) indirgeyici şeker yöntemi ve HPLC (McCleary ve McGeough, 2015) gibi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında yanlış olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir.

DNS yönteminin sınırlarına ilişkin bir başka ayrıntılı araştırma da, kimyasal reaksiyonlara bağlı olarak bileşiklerin hidrolizinin DNS tahlili ile renk etkileşimlerine neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Ek olarak, daha fazla hidrolize bileşiklerin daha yüksek derecede renk etkileşimlerine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, DNS reaktifinin ortamın yüksek sıcaklıklarından, basınçlarından ve pH'ından kolayca etkilendiği ve sonunda yanlış sonuçlara yol açabileceği gösterilmiştir (Rivers, Gracheck, Woodford ve Emert, 1983).

Özellikle püskürtmeli kuruma ile elde edilen numunelerin miktarlarında bu beklenmeyen değişimler görülmüştür. Püskürtmeli kurutma ve pH 7 örneklerinde karamelizasyon reaksiyonu olma durumu olabileceğinden bu metodun da glikasyon derecesinin tespitinde direk olarak kullanılamayacağı sonucu çıkmıştır.

Tablo 5. Farklı soya proteini: dekstroz oranlarına sahip glike örneklerin indirgen şeker miktarları (g/L) *pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

	İlk Dekstroz Miktarı(g/L)	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 7/PK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 10/PK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 7/DK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 10/DK]
1:01	5	102,6±2	84,0±2,0	64,2±1	49,6±1
2:01	3,33	107,5±0,6	79,9±1,2	59,8±0,3	109,9±3,6
3:01	2,5	116,8±1,2	19,6±0,8	72,4±2	44,4±2
5:01	1,67	144,9±1,2	7,2±1,2	40,1±1,2	38,3±1,8
10:01	0,91	116,5±1,1	5,5±0,1	20,9±1,1	28,5±1,1

Tablo 6. Farklı soya proteini: fruktoz oranlarına sahip glike örneklerin indirgen şeker miktarları (g/L) *pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

	İlk Dekstroz Miktarı(g/L)	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 7/PK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 10/PK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 7/DK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 10/DK]
1:01	5	91,4±0,6	86,1±1,2	60,0±2	40,8±0,4
2:01	3,33	124,7±1,5	79,6±1,5	48,1±2,7	36,9±0,6
3:01	2,5	110,1±1,2	71,8±0,8	57,7±1,6	31,8±0,9
5:01	1,67	125,1±1,2	26,7±0,6	51,7±1,8	38,8±0,6
10:01	0,91	123,3±1,1	5,48±0,2	33,6±1,1	38,0±1,1

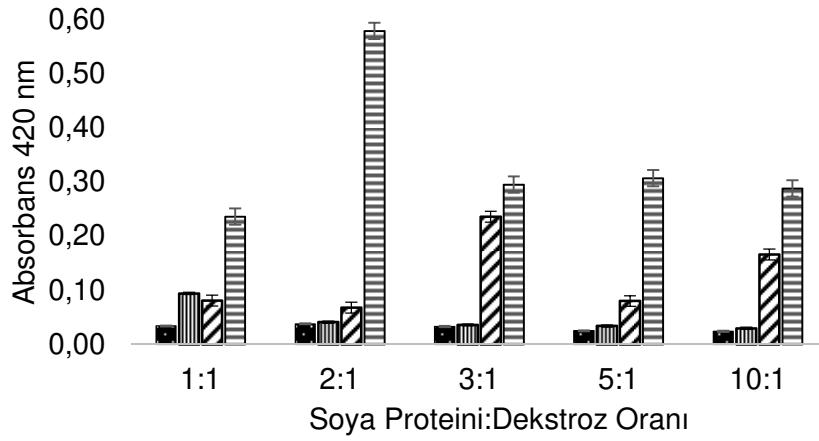
Tablo 7. Farklı soya proteini: D-psikoz oranlarına sahip glike örneklerin indirgen şeker miktarları (g/L) *pH 7/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 10/PK (Püskürtmeyle kurutulmuş), pH 7/DK (Dondurularak kurutulmuş), pH 10/DK (Dondurularak kurutulmuş)

	İlk Dekstroz Miktarı(g/L)	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 7/PK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 10/PK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 7/DK]	% Bağlanan Dekstroz Miktarı [pH 10/DK]
1:01	5	114,4±0,2	95,4±0,4	76,7±0,8	44,6±1,8
2:01	3,33	111,6±0,3	87,1±0,6	68,2±2,1	41,8±0,3
3:01	2,5	95,3±0,8	79,7±1,6	71,9±2,4	45,2±0,4
5:01	1,67	120,4±0,2	68,3±0,6	66,3±0,6	37,2±0,6
10:01	0,91	114,7±1,1	44,1±1,1	48,6±1,1	34,9±1,1

4.1.2.6. Glikasyon Derecesinin Tespiti

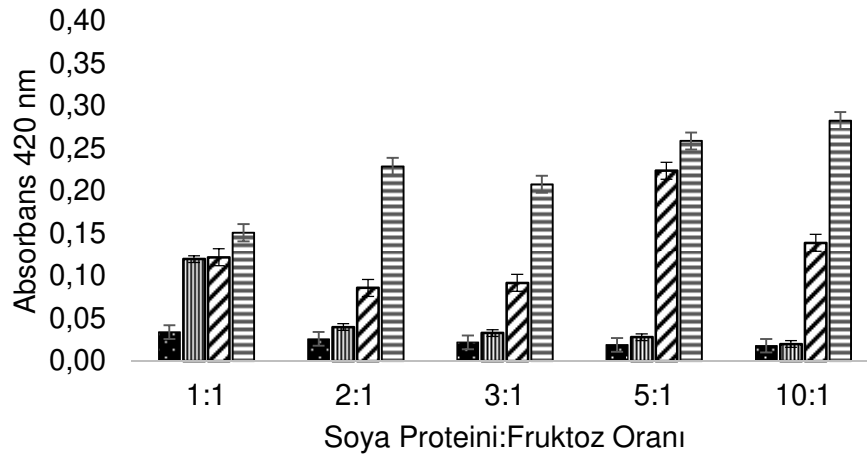
Esmerleşme, numunelerin glikasyon derecesi hakkında fikir verebilecek bir parametre olduğu düşünülebilir. Bu olayı izlemek ve reaksiyonun daha ileri aşamalara geçmediğinden emin olmak için esmerleşme derecesi genellikle 420 nm absorbans değerinde izlenmektedir (Yu ve ark., 2017).

Şekil 20'de, şekerin dekstroz olarak kullanıldığı örneklerinin glikasyon derecesinin belirlenmesi için 420 nm de absorbans değerleri okunmuştur. Şekil incelendiğinde pH 10 püskürtme ile kurutulmuş örnekler diğer formülasyonlara göre daha yüksek değerler göstermiştir. Bu dikkate alındığında pH ve kurutma sisteminin glikasyon üzerindeki büyük etkisi gözlemlenmiştir. pH'ın alkali bir aralıkta olmasının glikasyon üzerindeki hızlandırıcı etkisi göz önüne alındığında pH 10 örneklerin pH 7 ye oranla yüksek çıkması beklendiği gibi gerçekleşmiştir.



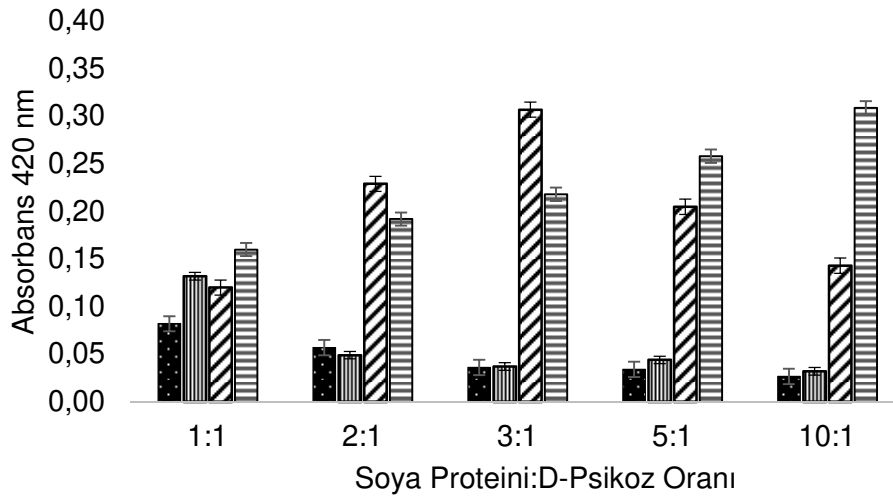
Şekil 20. Dekstroz şekerinin farklı formülasyonlarının glikasyon derecesinin absorbans değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

Şekil 21'de, şeker olarak kullanılan fruktozlu örneklerin glikasyon derecesinin belirlenmesi için 420 nm de absorbans değerleri okunmuştur. Şekil incelendiğinde pH 10 püskürtme ile kurutulmuş örnekler burada da diğer formülasyonlara göre daha yüksek değerler göstermiştir. Diğer taraftan, fruktoz şekerli örneklerde, pH'nın etkisi sabit tutulup kurutmanın etkisine bakıldığında, dondurarak kurutulan örneklerin püskürtme ile kurutulan örneklere göre daha az değerler göstermesi kurutma tipinin glikasyon üzerindeki büyük etkisini açığa çıkarmıştır.



Şekil 21. Fruktoz şekerinin farklı formülasyonlarının glikasyon derecesinin absorbans değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

Şekil 22'de, şeker olarak kullanılan D-Psikoz örneklerinin glikasyon derecesinin belirlenmesi için 420 nm de absorbans değerleri okunmuştur. Şekile bakıldığında diğer şekerlere benzer bir eğilim gözlenmiştir. Başka bir deyişe, püskürtme ile kurutmanın dondurarak kurutma ile gerçekleşen glikasyon üzerine domine eden etkisi burada da gözlemlenmiştir.



Şekil 22. D-Psikoz şekerinin farklı formülasyonlarının glikasyon derecesinin absorbans değerleri: ■ pH 7/ DK (Dondurularak kurutulmuş), ▨ pH 10 / DK (Dondurularak kurutulmuş), ▩ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ▤ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

kurutulmuş), ☐ pH 7 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş), ☐ pH 10 / PK (Püskürtme ile kurutulmuş)

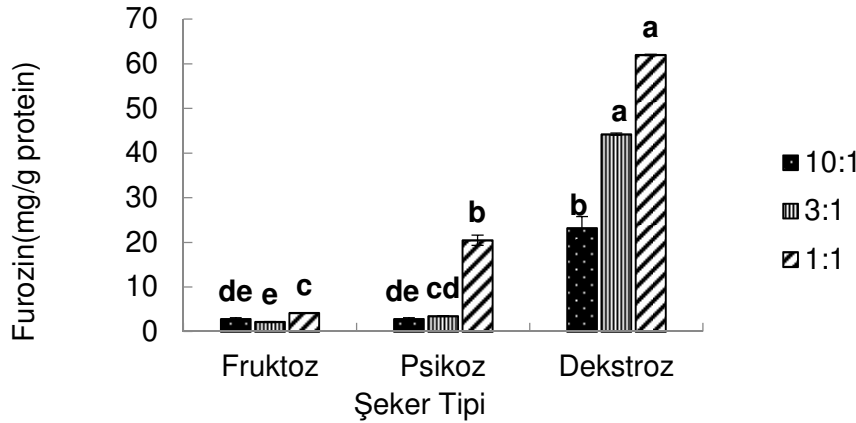
Genel bir değerlendirme yapıldığında, etkisi incelenen tüm faktörlerin glikasyon üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. Alkali pH'ın Maillard kahverengileşmesi üzerinde artan bir etkisi olduğu bilinmektedir (Tessier, 2010). Bu nedenle, Maillard esmerleşme oranının hem yüksek sıcaklıkta hem de alkali pH değerlerinde artması nedeniyle pH 10 ve püskürtme ile kurutulan numunelerin yüksek sonuçlarının olması bekleniyordu. Bunun dışında soya proteini: şeker oranı incelendiğinde, soya proteini konsantrasyonu artarken, dondurarak kurutma örneklerinde glikasyon derecesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Öte yandan, püskürtme ile kurutulan örneklerde zıt sonuçlar gözlemlenmiştir. Bu durum, iki mekanizmanın birbirinden farklı çalıştığı gerçeğiyle açıklanabilir. Dondurucu kurutucuda, numunelerde kurutma meydana gelirken, şekerlerin ve proteinlerin yapısal değişimi daha sonra inkübatörde kahverengi renk oluşumu üzerinde önemli bir etkiye neden olabilir. Şekerlerin dondurularak kurutulduktan sonra amorf hale geldiği ve bu şekilde daha fazla su emdikleri, dolayısıyla Maillard reaksiyon oranının etkilenebileceği gösterilmiştir (Grunin, Oztop, Guner ve Baltacı, 2019). Ayrıca, püskürtmeli kurutucuda, sıcaklık artışı hidrofilik maddelerin amino gruplarının açığa çıkmasına neden olabilir ve Maillard esmerleşmesine katılmaya yardımcı olup kahverengi renk oluşumuna katkıda bulunabilir. Literatürdeki bir çalışmada, sprey kurutucudaki peynir altı suyu proteini izolatu, farklı askorbik asitlerde protein konsantrasyonlarında (1: 100, 1:20, 1:10, 1: 5 ve 1: 2) çalışıldı ve protein oranı arttıkça glikasyon derecesinin arttığı gözlemlendi (Zhong, Tan ve Langrish, 2019).

Geri bildirim olarak belirtilen metodun kahverengi renk veren maddelerden kaynaklandığı ve düşük konsantrasyonda daha çok renk gösterebilen reaksiyon ürünlerinin de olabileceği düşünüldüğünde bu metodun glikasyon derecesinin tespiti için kullanılmasının yeterli olmadığı görüşüne varılmıştır.

4.1.2.7 Glikasyon ürünlerinin Tespiti: furozin, karboksimetillisin (CML), karboksietillisin (CEL) analizleri

Farklı oranlarda (10:1, 3:1, 1:1) soya proteini ve şeker (dekstroz, fruktoz, psikoz) içeren örneklerin başlangıç ve ileri glikasyon ürünlerini belirlemek amacıyla furozin, karboksimetillisin (CML), karboksietillisin (CEL) analizleri Hacettepe Üniversitesi Gıda

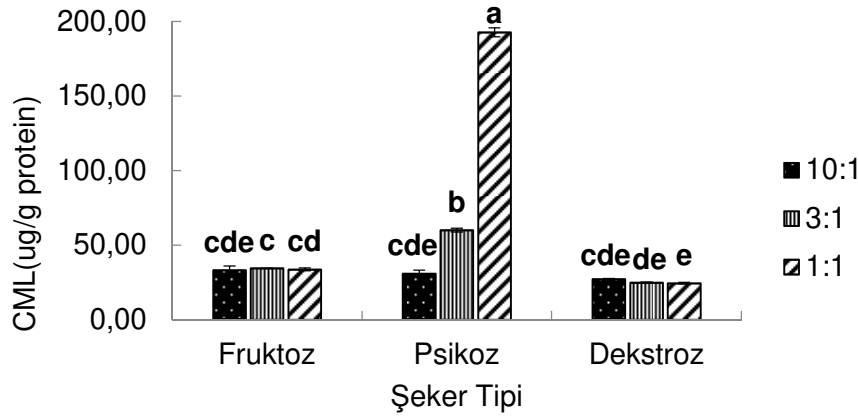
Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde duplikeli olarak çalışılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart hata değerleri ile verilmiş olup farklı gruplar arasındaki istatistiksel farklılık varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Burada çoklu faktör yerine numuneler kendi aralarında tekli varyans analizine göre değerlendirilmiştir. Şekil 23'teki grafik furozin analizine ait sonuçları göstermektedir. Bu sonuçlara göre şeker tipi ve protein şeker oranı furozin oluşumunu önemli bir şekilde etkilemektedir. En fazla furozin, glikozun furozin oluşumundaki yüksek reaktivitesinden dolayı glikozda sonrasında sırasıyla psikoz ve fruktozda tespit edilmiştir. 1:1 protein: şeker oranına sahip örnekler sırasıyla 3:1 ve 10:1 oranlarına sahip olanlardan daha fazla furozin oluşumuna neden olmuştur. Psikoz ile 1:1 protein şeker oranında hazırlanan örneklerde ortalama 61,96 mg/g protein furozin tespit edilmiştir. En az furozin miktarı da fruktoz-3:1 örneklerinde 2,15 mg/g protein olarak belirlenmiştir.



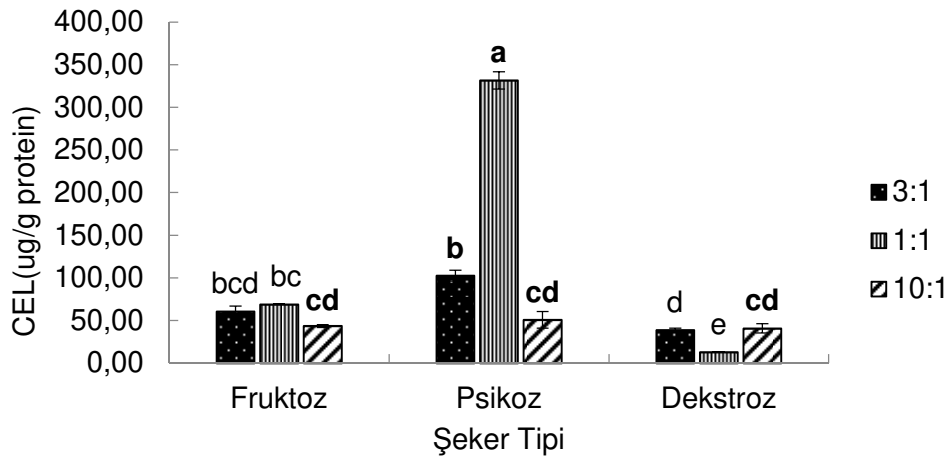
Şekil 23. Farklı protein: şeker (1:1, 3:1, 10:1) oranları ve farklı şeker türlerinden (fruktoz, psikoz, dekstroz) hazırlanan model sistemlerde furozin oluşumu

Şekil 24 ve Şekil 25'te protein üzerindeki lisin modifikasyonu sonucu oluşan ve ileri derecede glikasyon tespiti için kullanılan CML ve CEL sonuçları gösterilmektedir. Şeker tipi her iki reaksiyon ürününün oluşumunu istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilemektedir. Oluşan CML ve CEL miktarları sırasıyla psikoz, fruktoz ve glikozla doğru azalmaktadır. Şeker oranı arttıkça CML oluşumunda artış belirlenmiştir. 1:1 ve 3:1 protein şeker oranları arasında CEL oluşumu açısından önemli bir farklılık tespit edilmemiş olup 10:1 oranına sahip şekerlere kıyasla daha fazla CEL oluşumu gözlenmiştir. En yüksek CML ve CEL miktarları, psikozdan 1:1 oranında hazırlanan örneklerde 192.61 ve 331.59 ug/g protein olarak belirlenmiştir. En düşük CML ve CEL miktarları ise dekstroz-1:1 örneklerinde 24,5 ve 12,8 ug/g protein olarak bulunmuştur.

Sonuçlar literatürde belirtildiği gibi D-psikozun Maillard reaksiyona daha fazla girdiğini destekler niteliktedir. D-Psikozun 1:1 konsantrasyonlarında ciddi oranda CML ve CEL oluşumu gözlemlenmiştir.



Şekil 24. Farklı protein:şeker (1:1, 3:1, 10:1) oranları ve farklı şeker türlerinden (fruktoz, psikoz, dekstroz) hazırlanan model sistemlerde karboksimetilislin (CML) oluşumu



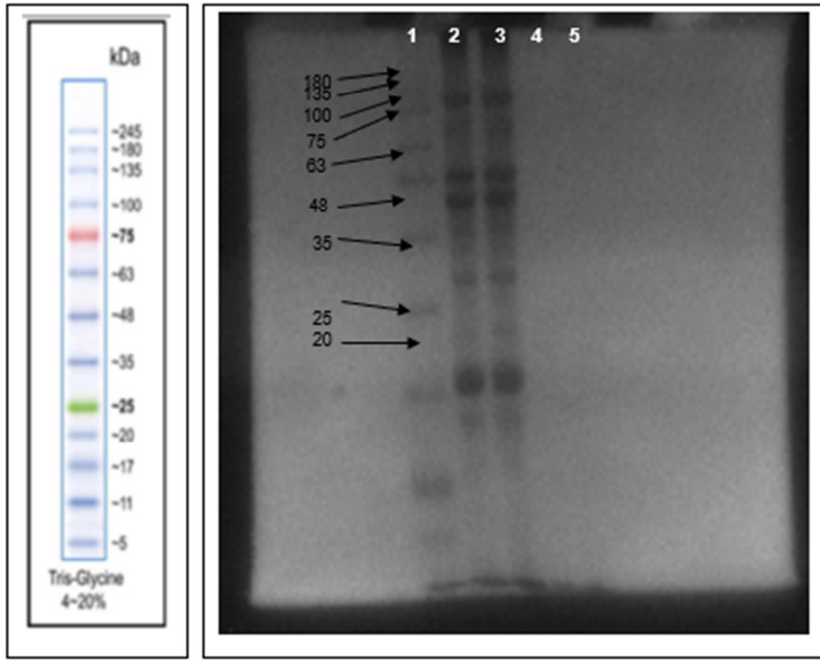
Şekil 25. Farklı protein:şeker (1:1, 3:1, 10:1) oranları ve farklı şeker türlerinden (fruktoz, psikoz, dekstroz) hazırlanan model sistemlerde karboksietilislin (CEL) oluşumu

4.1.2.8 Jel Elektroforez Deneyleri

4.1.2.8.1 Proteinlerin İzlenmesi

SDS PAGE deneyleri birkaç kere tekrarlanmıştır. Ancak benzer sonuçlar elde edilememiştir. Elde edilen jel görüntülerinden biri Şekil 26'da verilmiştir. Jeldeki şerit 1 molekül ağırlık kalibrasyon işaretleyicisi olup farklı molekül ağırlıklarına karşılık gelen proteinler ağırlıklarına göre ayrılmış olarak görülmektedir. Şerit 2 ve 3 doğal soya proteinine ait olup denatürasyon 2. şerit için 37°C de 45 dakika ve 3. şerit için 95°C de 5 dakika bekletilerek gerçekleşmiştir. Doğal soya proteinin alt birimleri iki koşul altında da aynı derecede denatüre olmuştur. Bu görülen bantların yoğunluğundan anlaşılabilmektedir. Şerit 2 ve 3 için soya proteinin temel alt birimleri jelde açıkça görünmektedir. Şerit 4 ve 5 D-psikoz şekeri ile glike edilmiş soya proteini olup deney sonucunda hiçbir bant görülmemiştir. Benzer sonuçlar glikoz ve fruktoz ile olan proteinler içinde elde edilmiştir. Gel kromatografisi ile glike proteinleri jelde yürütmek ve sonucunda bant görmek mümkün olmamıştır.

Kullandığımız glikasyon metodunda pH'nın sabit tutulması için tampon çözelti kullanılmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda bu yöndedir. Ancak dondurularak kurutma sonucunda ortamda bulunan tampon tuzlarının SDS ile birlikte denatürasyonu daha farklı etkilediği düşünülmüştür. Tampon tuzlarının, başta 10 mg/litre olarak hazırlanan protein konsantrasyonunu düşürdüğü ve bunun sonucunda bant görülmesini etkilediği sonucuna varılmıştır. Çünkü glike olmamış proteinler her koşulda bant göstermektedir. Bu hipotezi test etmek için glikasyon tampon çözelti yerine NaOH kullanarak yapılacak ve sonrasında tekrardan gel elektroforez deneyleri yapılacaktır.'



Şekil 26. Proteinlerin SDS PAGE ile analizi. %12'lik ayırıcı jelde yürümüş olan proteinlerin Coomassie Brilliant Blue G250 kullanılarak boyanmış UV ışık altında jel görüntüsü.

Şerit 1: SERVA Üç renkli protein standart II Molekül ağırlık işaretleyicisi (245, 180, 135, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17, 11, 5 kDa)

Şerit 2: Doğal soya proteini (37°C sıcaklıkta 45 dakika denatüre edilmiştir)

Şerit 3: Doğal soya proteini (95°C sıcaklıkta 5 dakika denatüre edilmiştir)

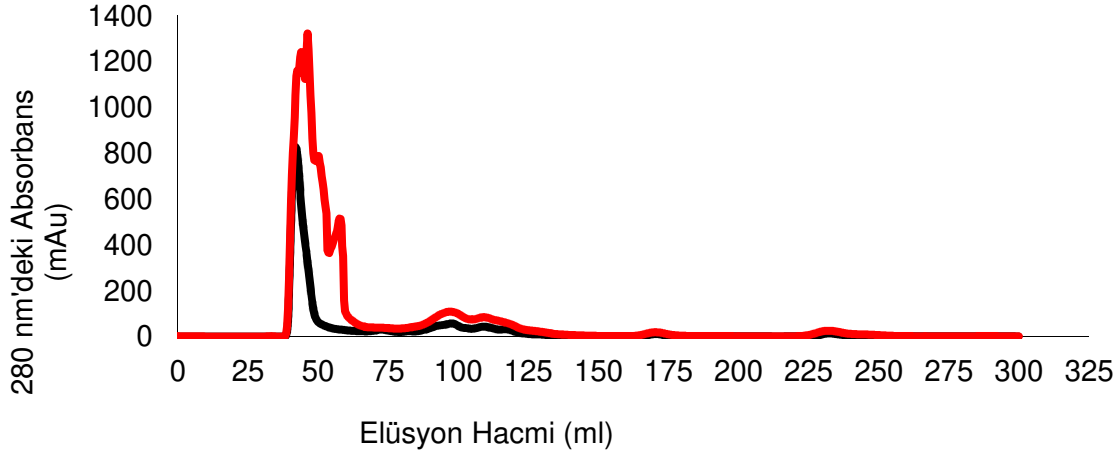
Şerit 4: D-psikoz kullanılarak glike edilmiş soya proteini (37°C sıcaklıkta 45 dakika denatüre edilmiştir)

Şerit 5: D-psikoz kullanılarak glike edilmiş soya proteini (95°C sıcaklıkta 5 dakika denatüre edilmiştir)

4.1.2.8.2 Jel Filtrasyon Kromatografisi (FPLC)

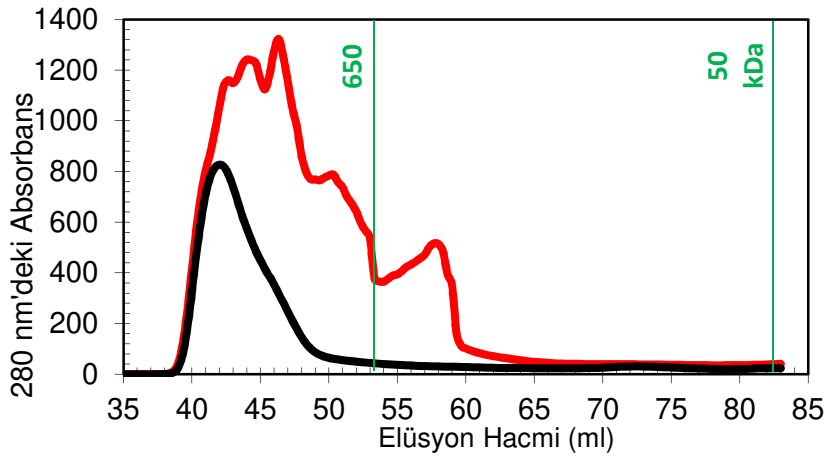
Denemeler sadece bir çeşit glike protein için yapılmıştır. Glike olmamış soya proteinine göre farklılık olup olmadığı tespit edilmiştir.

Kromatografi sonrası elde edilen grafikte doğal soya proteini ve glike soya proteini için okunan absorbans değerleri ve grafikteki tepe noktalarının değişimi görülmektedir. Grafikte bulunan tepe noktaları farklı molekül ağırlıklarındaki proteinleri temsil etmektedir ve molekül ağırlıklarını tespiti Kav ve Stoke's yarıçapının logaritması arasındaki ilişkiden belirlenir. Glike soya proteininde oluşan 4 farklı tepe noktalarında bulunan protein ağırlıkları hesaplandığında; 442, 844, 1199, 1429 kDa ağırlıklarında proteinler tespit edilmiştir.



Şekil 27. Soya proteini (doğal ve glike) için FPLC analizi (0-325 ml elüsyon hacmi) GP (—): Glike soya proteini (dekstroz şekeri ile), SP (—): Doğal soya proteini

Sonuçlar, glikasyon sonucu proteinin yapısının değiştiğini göstermektedir. Jel elektroforez deneylerinden sonuç alınamaması durumunda tekrardan birkaç glike protein için bu denemeler yapılacaktır.

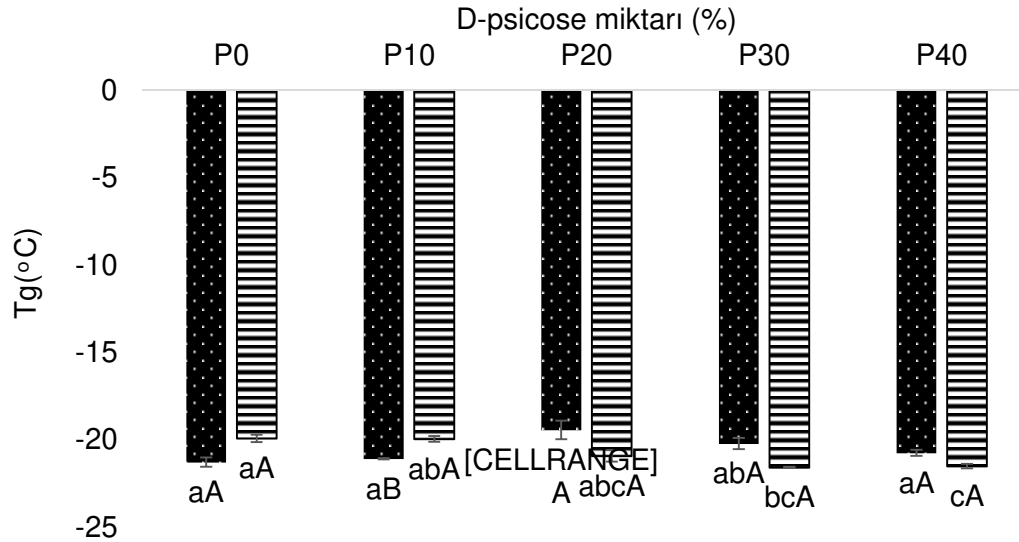


Şekil 28. Soya proteini (doğal ve glike) için FPLC analizi (35-85 ml elüsyon hacmi) Seri 1(—) : Glike soya proteini (dekstroz şekeri ile), Seri 2 (—) : Doğal soya proteini

4.2. Soya Proteini Veya Glike Olmuş Soya Proteini, D-Psikoz, Nişasta Veya Pektin İçeren Yumuşak Şekerlemelerin Tasarlanması, Karakterizasyonu, Depolama Çalışmalarının Yapılması

4.2.1. Fiziksel Analizler

4.2.1.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK) Deneyleri



Şekil 29. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin camsılığa geçiş sıcaklıkları (Tg) : ■ 0. Gün , ▨ 28. Gün

Küçük harfler, değişen D-Psikoz miktarına (%) göre anlamlı farklılık ifade ederken ($p < 0,05$), büyük harfler, her numunenin kendi içinde depolama süresince kıyaslanması sonucunda elde edilen anlamlı farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

Şekil 29'da görüldüğü üzere bütün Tg değerleri -19°C ve -24°C aralığında olup, depolama boyunca Tg değerlerini korudukları ve camsı olan amorf yapıdan uzaklaşarak, istenilen stabil jel yapısında kaldıkları gözlemlenmiştir. Şekilde de açıkça görüldüğü üzere, depolama sürecinin ilk gününde formülasyonlarda artan D-Psikoz kullanımıyla birlikte kayda değer bir değişim gözlemlenmemiştir ($p > 0,05$). Bunun yanı sıra, 28 günlük depolama süresi sonunda, D-psikoz miktarının artmasının Tg'de önemli bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Camsılığa geçiş sıcaklığının, formülasyonda bulunan polimerlerin bağ yapabilme derecelerinden, molekül ağırlıklarından ve ortamdaki su varlığından etkilendiği bilinmektedir (Ergun vd., 2017). İlk gün ölçümleri için, durağan eğilim gözlemlense de 28. günde azalış, artan nem içeriği ve buna bağlı olarak azalan sertlikle açıklanmıştır. Ayrıca, istatistiksel analizler göstermektedir ki 28 gün boyunca saklanan numuneler için Tg ve nem ile sertlik değerleri arasında güçlü bir korelasyon vardır. Pearson korelasyon katsayısı sırasıyla nem içeriği ve sertlik için 0,77 ve 0,66 ($p < 0,05$) olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, D-psikozun su ile olan yüksek etkileşimi ve suyun plastikleştirici etkisinden dolayı Tg değerleri azalmış, şekerler yumuşak dokularını depolama süresince koruyabilmişlerdir.

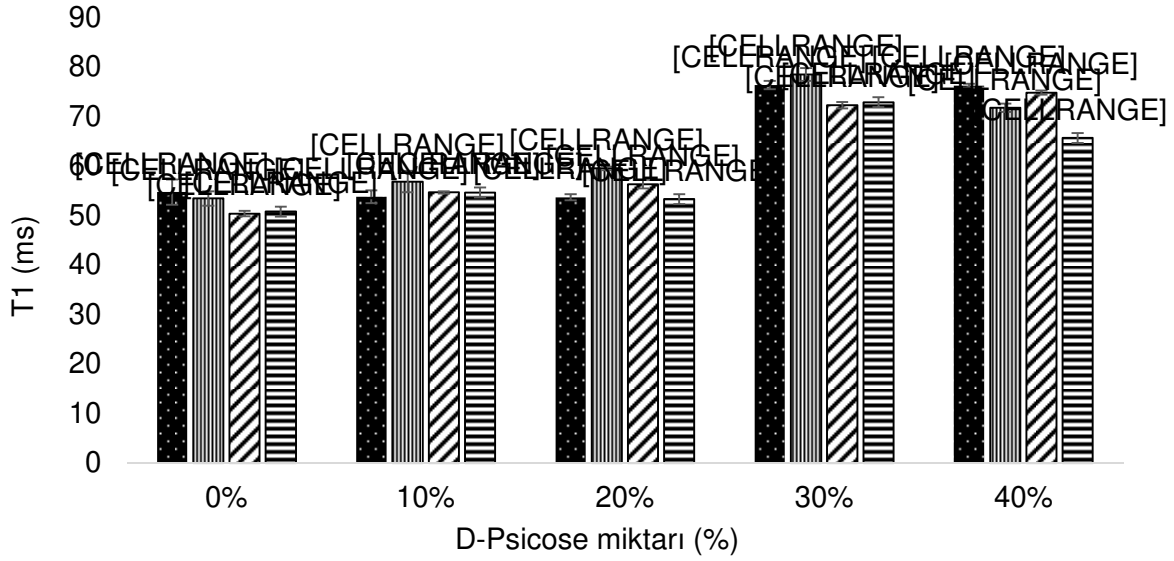
Tablo 8. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin camsılığa geçiş sıcaklıkları

Tg ($^{\circ}\text{C}$)	Depolama süresi (gün)	
	0	28
11_S0_R0	-36.68 ^{ab,A}	-35.19 ^{a,A}
11_S0_R10	-39.91 ^{b,A}	-39.39 ^{a,A}
11_S0_R20	-37.83 ^{ab,A}	-39.96 ^{a,B}
11_S0_R30	-39.24 ^{b,A}	-39.88 ^{a,A}
9_S2_R0	-35.12 ^{a,A}	-37.93 ^{a,A}
9_S2_R10	-39.30 ^{b,A}	-40.30 ^{a,a}
9_S2_R20	-38.00 ^{ab,A}	-40.52 ^{a,B}
9_S2_R30	-39.07 ^{b,A}	-39.69 ^{a,A}

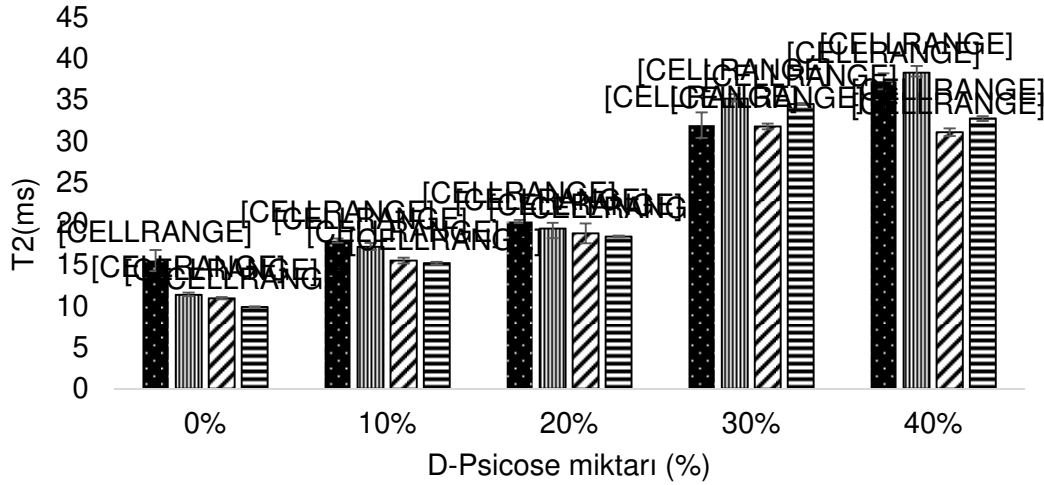
Küçük harfler, değişen D-Psikoz miktarına (%) göre anlamlı farklılık ifade ederken ($p < 0,05$), büyük harfler, her numunenin kendi içinde depolama süresince kıyaslanması sonucunda elde edilen anlamlı farklılıkları ifade eder ($p < 0,05$).

D-psikoz, nişasta ve izole soya protein kullanılarak hazırlanmış numunelerin camsılığa geçiş sıcaklıkları Tablo 8'de verilmiştir. Değişen D-psikoz miktarları (%) ile formülasyonun su tutma kapasitesine bağlı olarak değişeceği düşünülen Tg değerleri izole soya protein içermeyen formülasyonlar için artan D-psikoz miktarı ile değişmezken ($p>0,05$), soya içeren numuneler için D-psikoz eklenmesi Tg'de önemli ölçüde azalışa sebep olmuştur ($p<0,05$). Bunun yanı sıra, depolama süresinin ilk gününde gözlemlenmiştir ki, nişasta miktarının azaltılıp yerine izole soya protein eklenmesi camsılığa geçiş sıcaklığında önemli bir değişime sebep olmamıştır ($p>0,05$). Araştırmalar göstermektedir ki, protein zincir üzerindeki hidrofilik amino asit konsantrasyonu arttıkça su ile etkileşim artmakta ve suyun plastikleştirici etkisi ile Tg değeri artmaktadır (De Graaf, Madeka, Cocero, & Kokini, 1993). Tg değerleri her monosakkarit ve dissakkarit için farklı değerlerde elde edilmiştir (Ergun, Lietha, & Hartel, 2010). Buradan yola çıkarak, izole soya proteinin hidrofobik doğası ve D-psikoz ile yaptığı bağ sonucunda, hem d-psikoz hem de soya proteinin değişen su ile etkileşiminin Tg değerindeki azalmaya sebep olabileceği düşünülmüştür. Tablo 8'de görülebileceği üzere, 28 günlük depolama süresince, sadece 11_S0_R20 ve 9_S2_R20 numuneleri için Tg değerlerinde kayda değer değişim gözlemlenirken ($p<0,05$), diğer formülasyonlarda önemli bir artış veya azalış tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

4.2.1.2. NMR Relaksometre Deneyleri



Şekil 30. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin T1 relaksasyon zamanı değerleri: ■ 0. Gün, ▨ 7. Gün, ▩ 14. Gün, ▪ 21. Gün



Şekil 31. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin T2 relaksasyon zaman değerleri: ■ 0. Gün, ▨ 7. Gün, ▩ 14. Gün, ▪ 21. Gün

Farklı formülasyonlara sahip jelatin içeren şekerlemelerin T1 ve T2 değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 30 ve Şekil 31'de gösterilmiştir. Kontrol (%0), %10 ve %20 D-Psikoz içeren

örneklerin T1 değerlerinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken ($p>0,05$), D-Psikoz miktarı %30 ve %40'a çıkarıldığında T1 relaksasyon zamanlarında önemli ölçüde artış gözlenmiştir ($p<0,05$). T1 relaksasyon zamanı jel örneklerdeki su miktarıyla büyük ölçüde ilişkili olduğundan T1'daki artış D-Psikozun sükroza göre daha yüksek olan nem tutma kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir. 0. Gün için elde edilen T1 ve nem miktarı (%) verilerine korelasyon uygulandığında korelasyon katsayısı 0,976 olarak bulunmuş olup T1 ile nem (%) verilerinin yüksek oranda korele olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($p<0,05$). Şekil 31'te görüldüğü gibi T2 değerleri için de benzer sonuçlar bulunmuş olup 0. Gün için T2 ve nem (%) verileri arasında korelasyon katsayısı 0,898 olarak bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 9. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin T1 relaksasyon zamanı değerleri

T1 (ms)	Depolama süresi (gün)				
	0	7	14	21	28
11_S0_R0	49,68 ± 0,75 ^{bA}	51,02 ± 1,09 ^{bcA}	51,07 ± 0,16 ^{bcA}	49,46 ± 0,10 ^{bcA}	49,57 ± 0,63 ^{bA}
11_S0_R10	48,20 ± 0,72 ^{bcA}	47,49 ± 0,00 ^{dA}	47,92 ± 0,02 ^{cdeA}	47,05 ± 0,45 ^{cA}	47,03 ± 0,58 ^{cA}
11_S0_R20	45,90 ± 0,48 ^{cA}	44,87 ± 0,35 ^{eA}	45,20 ± 0,49 ^{eA}	46,88 ± 1,15 ^{cA}	46,75 ± 0,05 ^{cA}
11_S0_R30	41,30 ± 0,31 ^{dA}	41,74 ± 0,22 ^{fA}	41,48 ± 1,02 ^{fA}	41,99 ± 1,42 ^{dA}	41,51 ± 0,65 ^{dA}
9_S2_R0	50,95 ± 0,78 ^{bA}	51,57 ± 0,42 ^{bA}	51,57 ± 0,21 ^{bA}	51,88 ± 0,54 ^{bA}	51,33 ± 0,35 ^{bA}
9_S2_R10	54,88 ± 0,69 ^{aA}	56,10 ± 0,00 ^{aA}	57,20 ± 0,84 ^{aA}	57,30 ± 0,56 ^{aA}	55,10 ± 0,83 ^{aA}
9_S2_R20	49,79 ± 1,42 ^{bA}	48,95 ± 0,49 ^{cdA}	50,02 ± 1,16 ^{bcdA}	52,44 ± 1,70 ^{bA}	49,63 ± 0,48 ^{bA}
9_S2_R30	46,34 ± 0,13 ^{cA}	46,98 ± 0,95 ^{deA}	47,47 ± 1,51 ^{deA}	48,49 ± 0,98 ^{bcA}	46,09 ± 0,40 ^{cA}

Aynı sıra üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0,05$). Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, depolama süresi boyunca her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 10. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin T2 relaksasyon zamanı değerleri

T2 (ms)	Depolama süresi (gün)				
	0	7	14	21	28
11_S0_R0	1,96 ± 0,13 ^{ab,B}	2,53 ± 0,10 ^{a,A}	1,76 ± 0,13 ^{ab,B}	1,75 ± 0,12 ^{a,B}	2,05 ± 0,15 ^{b,AB}
11_S0_R10	1,95 ± 0,00 ^{ab,B}	2,41 ± 0,03 ^{a,A}	1,70 ± 0,01 ^{ab,C}	1,71 ± 0,03 ^{a,C}	2,08 ± 0,07 ^{b,B}
11_S0_R20	1,78 ± 0,10 ^{bc,AB}	1,95 ± 0,12 ^{b,A}	1,57 ± 0,10 ^{b,ABC}	1,22 ± 0,09 ^{b,C}	1,56 ± 0,05 ^{c,BC}
11_S0_R30	2,16 ± 0,15 ^{a,ABC}	2,65 ± 0,08 ^{a,AB}	2,03 ± 0,18 ^{a,BC}	1,84 ± 0,21 ^{a,C}	2,84 ± 0,25 ^{a,A}
9_S2_R0	1,52 ± 0,09 ^{c,A}	1,54 ± 0,01 ^{c,A}	1,40 ± 0,00 ^{bc,AB}	1,24 ± 0,00 ^{b,B}	0,96 ± 0,00 ^{d,C}
9_S2_R10	0,82 ± 0,01 ^{d,A}	0,76 ± 0,01 ^{e,BC}	0,75 ± 0,02 ^{c,C}	0,60 ± 0,01 ^{c,D}	0,81 ± 0,01 ^{d,AB}
9_S2_R20	1,01 ± 0,08 ^{d,A}	1,05 ± 0,07 ^{d,A}	0,91 ± 0,06 ^{c,AB}	0,66 ± 0,07 ^{c,B}	0,97 ± 0,01 ^{d,A}
9_S2_R30	1,08 ± 0,08 ^{d,A}	1,16 ± 0,00 ^{d,A}	1,01 ± 0,10 ^{c,A}	0,87 ± 0,06 ^{bc,A}	1,12 ± 0,08 ^{cd,A}

Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0,05$). Aynı sıra üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, depolama süresi boyunca her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Hazırlanan 8 farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin 0. gün için farklı T2 relaksasyon zamanlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Formülasyonlarda kullanılan şeker türü, şekerin su tutma kapasitesine bağlı olarak sistemdeki su mobilitesini etkilemektedir. Tablo 10 göstermektedir ki, %11 nişasta içeren formülasyonlarda D-psikoz kullanılması son üründe daha yüksek T2 relaksasyon değeri zamanına neden olmuştur. Spin-Spin Relaksasyon zamanı olarak da bilinen T2 değerinin, numune içerisindeki su mobilitesi hakkında fikir veren önemli bir parametre olduğu düşünülürse D-psikoz içeren numunelerin daha fazla su mobilitesine sahip olduğu söylenebilir. Ayrıca, istatistiksel analiz göstermektedir ki formülasyonlara soya proteini izolatu eklenmesi D-psikoz varlığında numunelerin T2 zamanlarında azalmaya neden olmaktadır ($p < 0,05$). Bu durum ortamdaki nişastanın azalması dolayısıyla daha az su bağlayabilmesi, soya proteinin düşük konsantrasyonlarda jelleşme yeteneğinin zayıf olması ve jelatinizasyonun gerçekleşmesi için gerekli zamanın uzaması ile ilişkilendirilebilir. Literatürde görülmüştür ki soya proteinin karbonhidrat içeren sistemlerde kullanılması, soya proteinin nişastanın jelatinizasyonu için ihtiyaç duyduğu suyu tutması nedeniyle hidrokolloid ağın oluşmasını engellemektedir (Hua, Cui, & Wang, 2003).

Tablo 11. Farklı formülasyona sahip pektin içeren şekerlemelerin T2 relaksasyon zamanı değerleri

	T ₂ (ms)	
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası
S0_SA_035	4.13±0.46 ^{a,A}	5.71±0.43 ^{abc,B}
S0_SA_1025	2.98±0.24 ^{b,A}	6.17±0.13 ^{ab,B}
S0_SA_2015	2.46±0.20 ^{bc,A}	4.66±0.79 ^{bc,B}
S0_SA_350	1.52±0.17 ^{cd,A}	3.49±0.38 ^{c,B}
S1_SA_035	4.20±0.64 ^{a,A}	7.07±0.61 ^{a,B}
S1_SA_1025	2.19±0.21 ^{bcd,A}	6.07±0.16 ^{abc,B}
S1_SA_2015	2.04±0.07 ^{bcd,A}	5.09±0.23 ^{bc,B}
S1_SA_350	1.45±0.20 ^{d,A}	3.92±0.72 ^{bc,B}

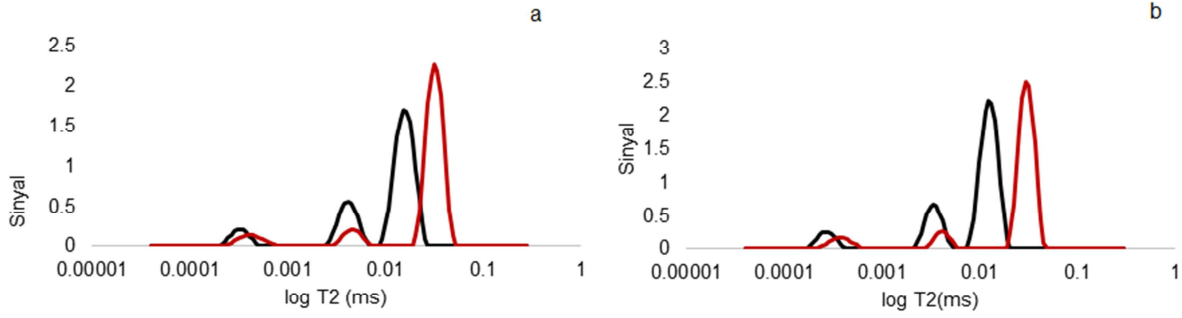
Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05). Aynı satır üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, sindirim sonrası her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05).

SPI ve D-psikoz ilavesinin pektin içeren yumuşak şekerlemeler üzerindeki etkisini açıklamak için T2 gevşeme sürelerinin analizi Tablo 11'de verilmiştir. Tablodan görülebileceği gibi, D-Allüloz içeren şeker formülasyonları, bütün soya proteini içeren formülasyonlar içinde en uzun T2 relaksasyon süresine sahiptir. Bu sonucu elde etmekteki en büyük nedenin sükrözün D-psikoz a göre su bağlama kapasitesinin daha fazla olması olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, sükröz iki monosakkarit olan fruktoz ve glukozdan oluşması sebebiyle daha yüksek H-bağı yapma kapasitesine sahiptir. Bu da T2 değerlerinde düşmeye neden olmuş olabilir.

Bunların yanısıra, sisteme izole soya proteini eklenmesi T2 değerlerinde bir değişikliğe sebep olmamıştır. Fakat 2 saatlik sindirim sonrası T2 değerlerinde kayda değer bir artış gözlenmektedir. Bu kayda değer artışın gözlenme sebebi, sindirim suyu içerisinde bulunan pektin jel matriksinin, şekerin çözünmesine bağlı olarak dağılması ve gevşemesi olabilir. Bu gevşemeye bağlı olarak şekerleme içerisine nüfus eden sindirim suyu, T2 değerlerinde artışa neden olmuş olabilir. Ayrıca, sindirim suyunun asidik yapısı göz önünde bulundurulduğunda ortamda serbest halde bulunan (H⁺) iyonları T2 değerini artırmış olabilir.

Ters Laplas uygulanması ile elde edilen NMR spektrum analizi yapılarak şekerleme ürünlerindeki pek çok proton popülasyonu hakkında bilgi edinmek mümkün olmuştur. Spin Track cihazıyla 40 ms'lık eko zamanlarına inilebildiğinden mobilitesi düşük protonlar

hakkında da bilgi edinebilmek mümkün olmuş, bundan dolayı spektrum analizi sonucunda sıvı numunelere göre oldukça fazla sayıda pik gözlenmiştir. Şekil 32’de jelatin içeren formülasyonların spektrum analizleri verilmiştir.



Şekil 32. Jelatin içeren yumuşak şekerlemelerinin depolamanın (a) ilk günü için örnek T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları : P0 (—) and P40 (—) (b) 28. günü için örnek T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları : P0 (—) and P40 (—)

Tablo 12. Jelatin bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her alanın T2 (spin-spin) relaksasyon sonuçları

(ms)		Süre (gün)		
	İsim	0	14	28
Pik 1	P0	0.35±0.00 ^{a,A}	0.25±0.00 ^{b,C}	0.28±0.00 ^{b,B}
	P10	0.34±0.01 ^{a,A}	0.34±0.01 ^{a,A}	0.35±0.00 ^{ab,A}
	P20	0.37±0.01 ^{a,A}	0.32±0.01 ^{a,A}	0.37±0.01 ^{a,A}
	P30	0.36±0.02 ^{a,A}	0.32±0.01 ^{a,A}	0.37±0.01 ^{a,A}
	P40	0.36±0.02 ^{a,A}	0.29±0.01 ^{ab,A}	0.36±0.02 ^{ab,A}
Pik 2	P0	5.00±0.35 ^{a,B}	3.00±0.07 ^{c,B}	3.60±0.00 ^{c,AB}
	P10	4.65±0.11 ^{a,A}	3.85±0.18 ^{c,A}	5.00±0.14 ^{ab,A}
	P20	5.00±0.14 ^{a,B}	7.70±0.21 ^{b,A}	5.50±0.00 ^{a,B}
	P30	5.20±0.00 ^{a,AB}	6.90±0.35 ^{ab,A}	4.80±0.00 ^{b,B}
	P40	6.45±0.32 ^{a,B}	9.25±0.46 ^{a,A}	4.80±0.00 ^{b,B}
Pik 3	P0	19.0±2.12 ^{b,A}	12.0±0.00 ^{d,A}	13.0±0.00 ^{c,A}
	P10	19.0±0.71 ^{b,A}	15.5±0.00 ^{cd,A}	18.5±0.00 ^{b,A}
	P20	22.0±0.00 ^{b,A}	21.5±1.77 ^{bc,A}	20.0±0.00 ^{b,A}
	P30	29.5±1.77 ^{ab,A}	29.0±0.00 ^{ab,A}	30.5±1.06 ^{a,A}
	P40	33.0±0.71 ^{a,A}	28.0±0.71 ^{a,A}	32.0±0.00 ^{a,A}

Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05). Aynı sıra üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, depolama süresi boyunca her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05).

Tablo 13. Jelatin bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her pik için göreceli alan sonuçları

(ms)		Süre (gün)		
İsim	0	14	28	
A 1(%)	P0	7.92±0.19 ^{a,A}	7.65±0.04 ^{a,A}	8.53±0.01 ^{a,A}
	P10	7.47±0.08 ^{a,A}	7.32±0.11 ^{a,A}	7.60±0.03 ^{a,A}
	P20	7.37±0.22 ^{a,A}	6.79±0.54 ^{a,A}	7.70±0.21 ^{a,A}
	P30	7.00±0.31 ^{a,A}	7.68±0.02 ^{a,A}	7.59±0,05 ^{a,A}
	P40	6.95±0.22 ^{a,A}	6.03±0.13 ^{a,B}	7.52±0.40 ^{a,A}
A 2(%)	P0	22.18±1.35 ^{a,A}	19.49±1.56 ^{ab,A}	22.21±0.30 ^{a,A}
	P10	17.86±0.07 ^{ab,A}	10.64±1.15 ^{c,B}	20.45±0.01 ^{b,A}
	P20	16.28±0.26 ^{b,B}	23.87±0.49 ^{a,A}	16.94±0.24 ^{c,B}
	P30	10.73±0.04 ^{c,B}	17.18±1.06 ^{abc,A}	10.43±0.09 ^{d,B}
	P40	9.71±0.32 ^{c,B}	15.35±0.51 ^{bc,A}	9.21±0.09 ^{d,B}
A 3(%)	P0	69.90±1.54 ^{d,A}	72.86±1.52 ^{bc,A}	69.27±0.27 ^{d,A}
	P10	74.67±0.16 ^{cd,B}	82.03±1.26 ^{a,A}	71.96±0.02 ^{c,B}
	P20	76.36±0.48 ^{bc,A}	69.36±0,05 ^{c,B}	75.36±0.64 ^{b,A}
	P30	82.27±0.36 ^{ab,A}	75.15±1.09 ^{abc,B}	81.99±0.14 ^{a,A}
	P40	83.34±0.00 ^{a,A}	78.65±0.39 ^{ab,A}	83.27±0.30 ^{a,A}

Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05). Aynı sıra üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, depolama süresi boyunca her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05).

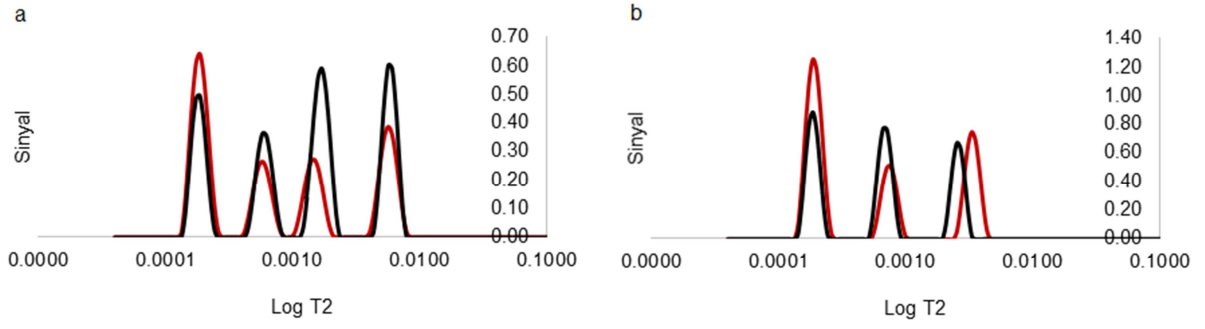
Bu çalışmada T2 eğrileri kullanılarak farklı görelî alanlara ve relaksasyon sürelerine sahip 3 farklı pik (P1, P2 and P3) elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 12 ve Tablo 13 'te verilmiştir. Her pik gel matrisi içindeki farklı su içeriğine proton havuzlarını ifade etmektedir. Daha önce peynir altı suyu kullanılarak hazırlanan kompozit jellerde 3 farklı proton havuzu bulunmuş, ilk pik katı-katı etkileşimi, ikinci pik polimer-su etkileşimi ve son pik jel matris içine hapsolmuş tutuklu su ile ilişkilendirilmiştir. Jelatin içeren yumuşak şekerlemelerde kompozit jel olduğu göz önünde bulundurularak spektrumların açıklanması için aynı analogi kullanılmıştır. Düşük eko zamanı (40 us) ile çalışılmış olması sayesinde elde edilen ve 0.25-0.37 ms aralığında tespit edilen düşük relaksasyon zamanları şeker molekülleri arasındaki etkileşimlerle ilişkilendirilmiştir ki yüksek şeker içeriği göz önünde bulundurulduğunda bu sonuç şaşırtıcı değildir. T2 relaksasyon sonuçlarına bakıldığında sisteme D-psikoz eklenmesi

kartı- katı etkileşimini kayda değer biçimde değiştirmemiştir ($p>0,05$). Daha önce belirtildiği üzere ikinci pik polimer-su interaksyonunu ifade etmektedir, sistemdeki tek jelleştirme ajanı jelatin olduğu için ikinci pik jelatin-su etkileşimi ile ilişkilendirilmiş, yüksek şeker içeriği de düşünülerek, jelatin-su etkileşiminin yanında şeker-su etkileşiminin de ikinci pik üzerinde önemli bir etkisi olduğu düşünülmüştür. Bütün formülasyonlarda aynı miktarda jelatin kullanılmış olması ortaya çıkan farklı T2 relaksasyon zamanları ve görelî alanlar elde edilmesinde şeker-su etkileşimin etkili olduğunu göstermektedir.

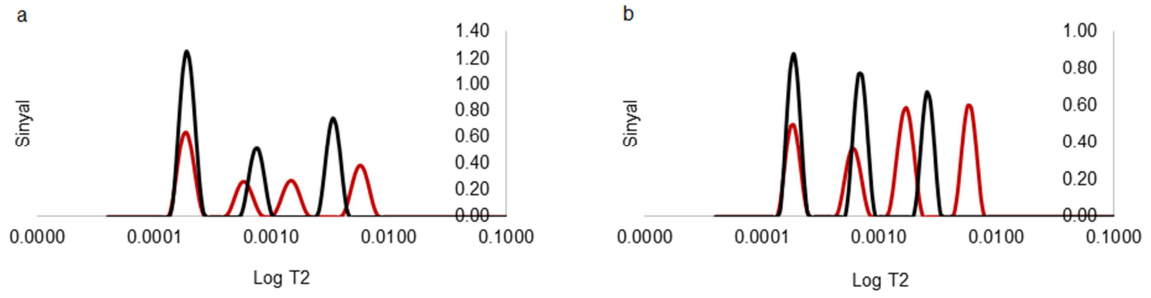
Literatürdeki çalışmalarda farklı şekerlerin T2 relaksasyon zamanları ölçülmüş, en düşük relaksasyon zamanının glikoz ve fruktoz a kıyasla sükroz için elde edilmesi yüksek moleküler ağırlık ve değişken OH grupların fazlalığı ile açıklanmıştır (Aroulmoji, Mathlouthi, Feruglio, Murano, & Grassi, 2011). T2 relaksasyon sürelerindeki artışı moleküllerin su ile olan etkileşimi ile açıklanmıştır. D-psikozun fruktoza benzeyen yapısı ve higroskopik özellikleri T2 sürelerinde artışa neden olduğu düşünülmektedir.

Üçüncü pik (P3) daha önce de belirtildiği gibi jelatin jel ağında hapsolmuş suyu ifade etmektedir ve diğer piklere göre relaksasyon sürelerinin daha uzun olduğu tespit edilmiştir, bu da daha mobil halde bulunan proton havuzlarıyla ilgilidir. Suyun T2 (spin-spin) relaksasyon süresi 3s civarında olmasına rağmen üçüncü pik ile elde edilen 12-32 ms relaksasyon süresinin jel ağı içindeki serbest suda çözülmüş şeker moleküllerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

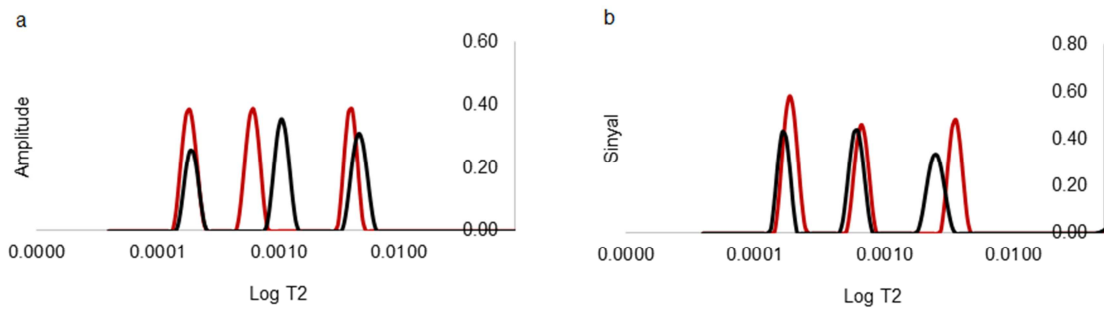
Bu spektrumlardan elde edilen bilgilere dayanarak, depolama süresince değişmeyen relaksasyon süreleri ve görelî alanlar, jelatin ağının stabilitesini koruduğunu göstermektedir. Bunun yanında formülasyonlarda sükroz yerine D-psikoz kullanılması piklerin kaymasına ve son pik alanın artmasına neden olmuştur.



Şekil 33. Nişasta ve izole soya proteini içeren yumuşak şekerlemelerinin D-psikoz yer değiştirmesi ile değişen T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları: (a) 11_S0_R30 (—) and 11_S0_R0 (—) (b) 9_S2_R30 (—) and 9_S2_R0 (—)



Şekil 34. Aynı miktarda D-psikoz kullanılarak hazırlanmış formülasyonlar için izole soya proteini eklenmesi ile değişen T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları: (a) 9_S2_R0 (—) and 11_S0_R0 (—) (b) 9_S2_R30 (—) and 11_S0_R30 (—)



Şekil 35. Nişasta içeren yumuşak şekerlemelerin 28. gün sonunda D-psikoz yer değiştirmesi ile değişen T2 Relaksasyon Spektrum sonuçları: (a) 11_S0_R30 (—) and 11_S0_R0 (—) (b) 9_S2_R30 (—) and 9_S2_R0 (—)

Tablo 14a. Nişasta bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her alanın T2 (spin-spin) relaksasyon sonuçları

		(ms)	Depolama süresi (gün)			
		0	7	14	21	28
Pik 1	11_S0_R0	0.19 a,A	0.20 a,A	0.20 a,A	0.20 a,A	0.20 ab,A
	11_S0_R10	0.21 a,A	0.20 a,A	0.21 a,A	0.20 a,A	0.21 a,A
	11_S0_R20	0.20 a,A	0.21 a,A	0.20 a,A	0.18 a,A	0.19 ab,A
	11_S0_R30	0.19 a,A	0.19 ab,A	0.19 ab,A	0.19 a,A	0.21 a,A
	9_S2_R0	0.18 a,A	0.19 ab,A	0.20 a,A	0.17 a,A	0.19 ab,A
	9_S2_R10	0.14 b,A	0.13 c,A	0.14 b,A	0.14 a,A	0.16 b,A
	9_S2_R20	0.18 a,A	0.17 b,A	0.17 ab,A	0.16 a,A	0.17 ab,A
	9_S2_R30	0.20 a,A	0.20 a,A	0.19 ab,A	0.18 a,A	0.16 b,A
Pik 2	11_S0_R0	0.49 bc,A	0.82 ab,A	0.77 ab,A	0.78 ab,A	0.73 bc,A
	11_S0_R10	0.61 bc,B	0.47 b,B	0.53 bc,B	0.87 ab,A	0.91 ab,A
	11_S0_R20	0.97 a,A	1.02 a,A	0.99 a,A	0.74 ab,A	0.77 bc,A
	11_S0_R30	0.65 abc,B	0.77 ab,B	0.77 ab,B	0.63 b,B	1.15 a,A
	9_S2_R0	0.74 ab,A	0.70 ab,A	0.79 ab,A	0.70 ab,A	0.63 c,A
	9_S2_R10	0.38 c,B	0.44 b,B	0.44 c,B	1.10 a,A	0.57 c,B
	9_S2_R20	0.64 abc,A	0.59 ab,A	0.59 bc,A	0.63 b,A	0.55 c,A
	9_S2_R30	0.70 abc,A	0.68 ab,A	0.70 abc,A	0.61 b,A	0.63 c,A
Pik 3	11_S0_R0	1.30 d,B	4.25 a,A	4.40 a,A	3.70 a,A	4.40 ab,A
	11_S0_R10	1.35 d,C	1.25 d,C	1.20 e,C	3.70 a,B	4.40 ab,A
	11_S0_R20	4.25 a,A	4.25 a,A	3.85 ab,AB	2.90 abc,B	3.35 bc,AB
	11_S0_R30	1.90 cd,B	2.70 bc,B	2.75 c,B	1.65 d,B	5.00 a,A
	9_S2_R0	3.30 b,A	3.20 ab,A	3.10 bc,A	2.70 abcd,A	3.35 bc,A
	9_S2_R10	1.55 d,B	1.60 cd,B	1.50 de,B	3.40 ab,A	1.75 d,B
	9_S2_R20	2.40 c,A	2.40 bcd,A	2.25 cd,A	2.05 cd,A	2.30 cd,A
	9_S2_R30	2.65 bc,A	2.55 bcd,A	2.65 c,A	2.25 bcd,A	2.60 cd,A
Pik 4	11_S0_R0	5.70 a,A	*	*	*	*
	11_S0_R10	5.30 b,A	5.15 a,A	4.55 b,C	*	*
	11_S0_R20	*	*	*	*	*
	11_S0_R30	5.90 a,A	15.00 a,A	16.00 a,A	5.70 a,A	*
	9_S2_R0	*	*	*	*	*
	9_S2_R10	*	*	*	*	*
	9_S2_R20	*	*	*	*	*
	9_S2_R30	*	*	*	*	*

Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05). Aynı sıra üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, depolama süresi

boyunca her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 14b : Nişasta bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her pik için göreceli alan sonuçları

		(%)	Depolama süresi (gün)				
		0	7	14	21	28	
RA 1	11_S0_R0	36.21 cd,A	40.11 d,A	45.71 cd,A	48.00 bc,A	37.13 bc,A	
	11_S0_R10	37.46 c,AB	31.03 e,B	35.93 e,B	43.83 c,A	36.88 bc,AB	
	11_S0_R20	38.03 bc,AB	39.57 d,AB	39.38 de,AB	42.14 c,A	36.49 bc,B	
	11_S0_R30	24.24 d,A	25.30 f,A	24.77 f,A	27.08 d,A	25.82 d,A	
	9_S2_R0	50.16 ab,B	52.52 b,AB	54.21 ab,AB	55.83 ab,A	40.48 b,C	
	9_S2_R10	53.33 a,A	58.54 a,A	59.68 a,A	64.16 a,A	60.96 a,A	
	9_S2_R20	47.56 abc,B	46.08 c,B	48.43 bc,B	56.14 ab,A	42.23 b,B	
	9_S2_R30	38.73 bc,B	39.88 d,AB	39.73 de,AB	44.57 c,A	32.41 c,C	
RA 2	11_S0_R0	14.42 c,B	30.54 ab,A	25.96 ab,AB	23.73 abcd,AB	33.06 abc,A	
	11_S0_R10	13.55 c,B	31.03 a,A	13.38 c,B	27.67 abc,A	32.29 bc,A	
	11_S0_R20	32.93 a,A	32.58 a,A	32.98 a,A	30.35 ab,B	33.82 ab,A	
	11_S0_R30	20.84 bc,A	26.82 ab,A	26.90 ab,A	20.15 cd,A	37.65 a,A	
	9_S2_R0	21.71 bc,B	18.24 bc,BC	18.13 bc,BC	15.69 d,C	28.42 c,A	
	9_S2_R10	18.27 bc,A	13.57 c,AB	11.66 c,AB	31.97 a,C	10.90 d,BC	
	9_S2_R20	26.45 ab,A	28.52 ab,A	26.11 ag,A	22.39 bcd,B	29.74 bc,A	
	9_S2_R30	34.40 a,B	33.68 a,B	35.79 a,A	30.96 ab,B	37.41 a,A	
RA 3	11_S0_R0	22.86 a,A	29.37 b,A	28.34 b,A	28.27 ab,A	29.82 b,A	
	11_S0_R10	21.93 a,C	19.37 d,D	23.52 b,C	28.35 ab,B	30.85 b,A	
	11_S0_R20	29.05 a,AB	27.86 bc,B	27.64 b,B	27.52 ab,B	29.70 b,A	
	11_S0_R30	28.81 a,A	33.92 a,A	36.19 a,A	32.70 a,A	36.54 a,A	
	9_S2_R0	28.13 a,BC	29.25 b,B	27.61 b,C	28.49 ab,BC	31.10 b,A	
	9_S2_R10	28.41 a,A	27.90 bc,A	28.64 b,A	3.88 d,B	28.14 b,A	
	9_S2_R20	26.00 a,A	25.41 c,A	25.46 b,A	21.48 c,B	28.05 b,A	
	9_S2_R30	26.87 a,AB	26.46 bc,AB	24.50 b,B	24.48 cd,B	30.18 b,A	
RA 4	11_S0_R0	26.52 a,A	*	*	*	*	
	11_S0_R10	27.06 a,A	26.76 a,A	27.17 a,A	*	*	
	11_S0_R20	*	*	*	*	*	
	11_S0_R30	25.24 a,A	13.97 b,AB	12.15 a,AB	20.08 a,A	*	
	9_S2_R0	*	*	*	*	*	
	9_S2_R10	*	*	*	*	*	
	9_S2_R20	*	*	*	*	*	
	9_S2_R30	*	*	*	*	*	

Aynı sütun üzerindeki ortalamalar, küçük harflerle (a-d) işaretlenmiştir ve formülasyonlardaki anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05). Aynı sıra üzerindeki ortalamalar, büyük harflerle (A-B) işaretlenmiştir, depolama süresi

boyunca her formülasyonun kendi içinde kıyaslanması ile elde edilen anlamlı farklılıkları ifade etmektedir (p <0,05).

Şekil 33-34 ve 35 nişasta ve izole soya proteini içeren formülasyonların NNLS analizi sonucu elde edilmiş spektrumları göstermektedir. Daha önce de belirtildiği gibi 40 ms gibi düşük eko süresi kullanılması katı-katı etkileşimi hakkında bilgi edinilmesine olanak sağlamıştır. Elde edilen pikler ve görelî alanlar Tablo 14a ve Tablo14b de verilmiştir. En düşük relaksasyon süresi ve en geniş görelî alan ilk pik için bulunmuş ve bu pikin şeker-şeker, şeker-protein, şeker nişasta veya protein-nişasta gibi su ile etkileşime girmemiş katı bileşenlerin kendi arasındaki etkileşiminden kaynaklı olduğu düşünülmüştür. 9_S2_R10 numunesi incelendiğinde, birinci pik için relaksasyon süresi ve bu pikin görelî alanının diğer numuneler içinde sırasıyla en küçük ve en büyük değere sahip olduğu görülmektedir. Yüksek görelî alan proton havuzlarının çokluğu ile ilişkilendirilir. Literatürdeki çalışmalarda ortamda birden fazla polimer olması ve şeker konsantrasyonunu fazlalığı ortamdaki su için rekabeti artırmakta bu durum da jelleşme davranışını etkilemekte dolayısıyla jel ağı içine hapsedilmiş su miktarını etkilemektedir (Burey vd., 2009; De Kruif & Tuinier, 2001). Nişasta moleküllerinin jelatinize olduklarında sıvı benzeri özellik gösterdiği bunun yanında tamamıyla jelatinizasyonu tamamlanmadıysa daha katı benzeri davranış gösterdiği tespit edilmiştir (Mariette, 2010). Numune formülasyonu incelendiğinde içeriğinde bulunan birden fazla polimerler ve şeker molekülü ortamdaki su için rekabeti artırmış nişastanın jelleşme kabiliyetini düşürerek, katı-katı etkileşiminin artmasına neden olmuş olabilir. Aynı sonucun daha fazla D-psikoz içeren 9_S2_R20 numunesinde görülmemesinin sebebi, D-psikozun jelatinizasyonu destekleyici etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Ikeda, Furuta, Fujita, & Gohtani, 2014).

Şekil 33a-b Şekil 34a-b ve Tablo 14b incelendiğinde polimer-su etkileşimini ifade eden ara piklerin görelî alanları D-psikoz konsantrasyonunun artması ile artmakta, ve NNLS spektrası sağa doğru kaymaktadır. NNLS spektrasında sağa doğru kayma relaksasyon süresinin arttığını göstermektedir. Literatürde Sükrozun daha yüksek moleküler ağırlık ve daha değişken özellik gösteren OH grupları sebebiyle D-glikoz ve D-fruktoza göre daha düşük relaksasyon süresine sahip olduğu tespit edilmiştir (Aroulmoji vd., 2011). Bu nedenle artan relaksasyon süresi ve görelî alan D-psikoz'un D-fruktoz'a benzer kimyasal yapısı ve D-psikoz varlığında gelişen polimer-su etkileşimi ile açıklanmıştır.

Şekil 34a ve Şekil 34 b de görülebileceği gibi, %11 nişasta içeren formülasyonlarda 4 pik elde edilmişken izole soya proteinin sisteme dahil edilmesiyle pik sayısı 3 e inmiştir. Ara

pikler polimer su ilişkisinden kaynaklı proton havuzlarıyla ifade edilir, bu durumda sadece nişasta içeren formülasyonlarda ara pikler nişasta-su ve şeker-su ile ilişkisinden gelen proton havuzları olarak düşünülebilir. İzole soya proteini sisteme dahil olduğunda başlayan Maillard reaksiyonları sonucu sistemde bulunan serbest şeker protein ile bağ yaparak daha kompleks bir polimer ağı oluşturmuş buna bağlı olarak ayrı 2 pik halinde karşımıza çıkan proton havuzları yeni H-bağları ile tek bir pik vermiş olabilir. Sistemde birden fazla polimer varlığında, polimerler arası su ile bağ yapma rekabeti sebebiyle nişastanın su ile bağ yapabilme ihtimalinin azaldığı (Burey vd., 2009; De Kruif & Tuinier, 2001) bilgisi göz önünde bulundurulduğunda, sisteme izole soya proteini eklenmesiyle nişasta-su ilişkisinin zayıflaması şaşırtıcı değildir. D-psikoz kullanıldığında ara pik alanı büyümekte bu da D-psikozun Maillard reaksiyonları destekleyici etkisini kanıtlamaktadır (O'Charoen, Hayakawa, & Ogawa, 2015; Yuanxia Sun, Hayakawa, Ogawa, & Izumori, 2005).

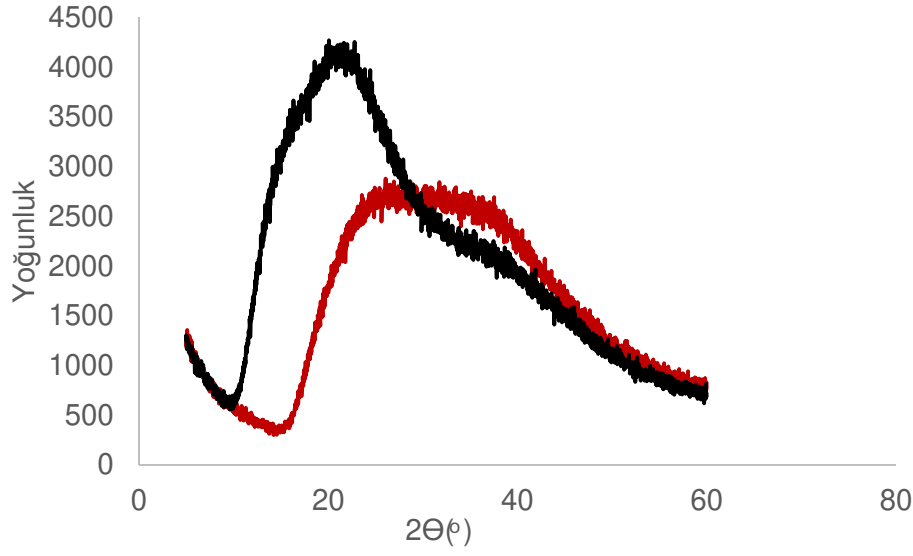
Şekil 35a-b, 28 günlük depolama çalışması sonuçlarını göstermektedir. Sadece nişasta içeren numuneler karşılaştırıldığında sükroz içeren formülasyon D-psikoz ile hazırlanana kıyasla daha düşük relaksasyon süresine sahiptir, bu da daha düşük polimer-su ilişkisi ya da jel ağı içerisinde hapsolmuş daha az suya işaret etmektedir. Buna ek olarak ilk pikin kıyasla daha büyük görelî alana sahip olması daha güçlü katı-katın etkileşimini göstermektedir ki bu durum retrogradasyonun sükroz içeren numunelerde daha çok olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, D-psikozun retrogradasyonu geciktirici etkisinden söz edilebilir.

Tablo 15. Pektin bazlı yumuşak şekerler için relaksasyon spektrumunda gözlenen her pik için görelî alan sonuçları ve her alanın T2 (spin-spin) relaksasyon sonuçları

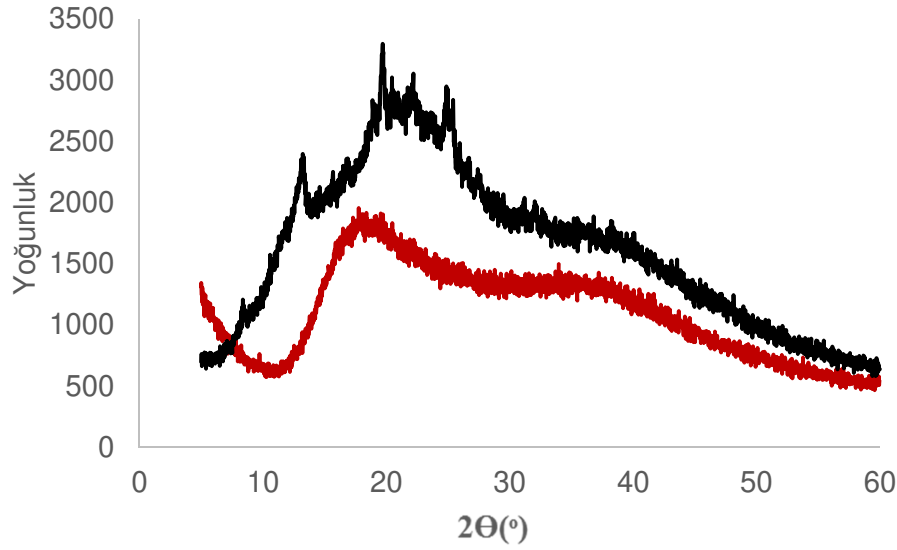
	Numune	T ₂ (ms)	Görelî alan (%)
Pik 1	s0_SA_035	1.50±0.0007 ^{ab}	38.65±0.13 ^b
	s0_SA_1025	1.00±0.0000 ^b	32.10±0.02 ^b
	s0_SA_2015	2.50±0.0007 ^a	100.00±0.00 ^a
	s0_SA_350	2.00±0.0000 ^a	100.00±0.00 ^a
	s1_SA_035	1.00±0.0000 ^b	32.40±0.05 ^b
	s1_SA_1025	0.78±0.0001 ^b	64.80±0.13 ^{ab}
	s1_SA_2015	0.89±0.00007 ^b	49.30±0.03 ^b
	s1_SA_350	0.72±0.00004 ^b	60.25±0.02 ^b
Pik 2	s0_SA_035	4.00±0.0014 ^{ab}	61.35±0.13 ^a
	s0_SA_1025	4.00±0.0000 ^{ab}	67.90±0.02 ^a
	s0_SA_2015	-	-
	s0_SA_350	-	-
	s1_SA_035	4.50±0.0007 ^a	67.60±0.08 ^a
	s1_SA_1025	1.50±0.0007 ^c	35.20±0.13 ^a
	s1_SA_2015	3.00±0.0000 ^{abc}	50.70±0.03 ^a
	s1_SA_350	2.00±0.0000 ^{bc}	39.75±0.02 ^a

Pektin içeren yumuşak şekerlemeler için T₂ relaksasyon süreleri ve görelî alanları Tablo 15'te verilmiştir. Proton havuzlarının % katkısı, bu bileşenin genel jel matrisine katkısı hakkında fikir vermektedir. Bu çalışmada, şekerler için 2 bileşen gözlenmiştir. Her peak noktası farklı proton havuzlarını temsil etmektedir. Çok kısa gevşeme sürelerine sahip ilk proton havuzu (0.7-2.5 ms), numunedeki katı fraksiyonlarla ilişkilendirilirken (Ozel, Uguz, Kilercioglu, Grunin, & Oztop, 2017; Poca et al., 2019), uzun T₂ (> 1.5 ms) değerine sahip olan ikinci proton havuzu, jel matriksinde tutulmuş su ile ilişkilendirilmiştir. Yüksek metoksilli pektin jellerinde, şeker, olası pektin-su etkileşimlerinin ortadan kaldırması için eklenmektedir ve bu sayede pektin moleküllerinin, güçlü bir jel yapısı oluşturmak üzere birbirleriyle etkileşime girmesine izin verir. Dolayısıyla, bu pik noktası, pektin-pektin etkileşimden kaynaklı protonlarla ilişkili olabilir. Daha önce belirtildiği gibi, ikinci tepe noktası en uzun T₂ değerine sahiptir ve jel sisteminde tutulan suyla ilişkilendirilmiştir. Buradaki su, çözünmüş şeker miktarının yüksek olması nedeniyle tamamen serbest değildir. Bununla birlikte, bu bölmedeki suyun hareketliliği diğer bölmelerden daha yüksek olduğundan, bu bölme, ilk tepe noktasına kıyasla hala uzun bir T₂'ye sahiptir.

4.2.1.3. X-ray Difraksiyon Deneyleri (XRD)

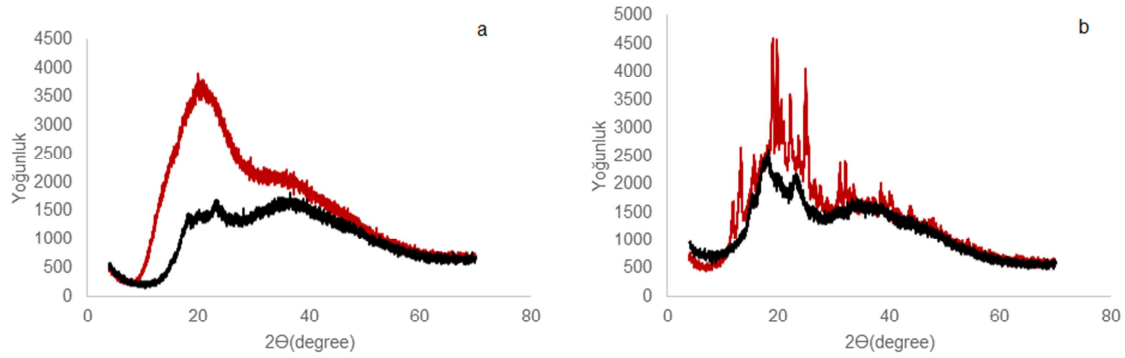


Şekil 36. %0 ve %40 D-Psikoz içeren jelatinli şekerlemelerin 0. Gün X-ray sonuçları: P0 (—) ve P40 (—)

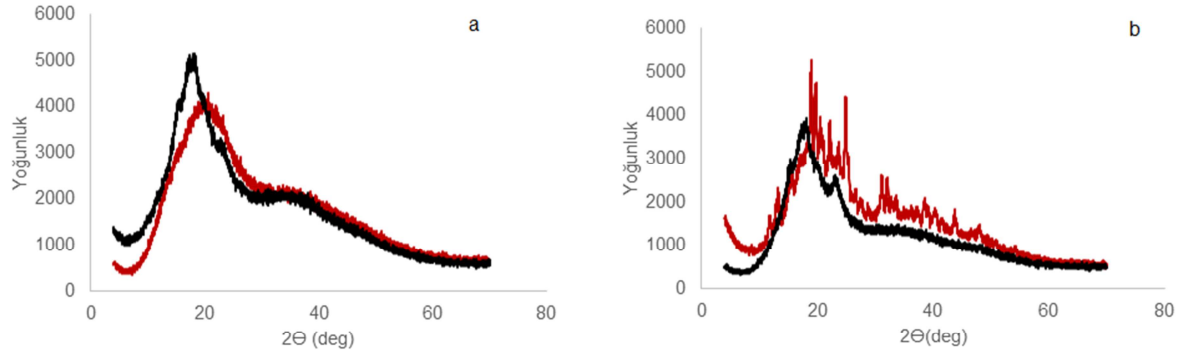


Şekil 37. %0 ve %40 D-Psikoz içeren jelatinli şekerlemelerin 28. Gün X-ray sonuçları: P0 (—) ve P40 (—)

X-ray difraksiyon sonuçlarına göre daha dar ve yoğunluğu yüksek olan pikler kristal bölgelerle ilişkilendirilirken, geniş ve yoğunluğu az olan pikler amorf bölgelerle ilişkilendirilir (Brown, 1966). Buna göre Şekil 36'da görüldüğü üzere, depolama sürecinin ilk gününde dahi %0 D-psikoz içeren yani sadece sükroz içeren kontrol örneğinin kristalinitesinin oldukça yüksek olduğunu söylemek doğru bir yaklaşımdır. Şekil 37'de ise, 28 günlük depolama sürecinin sonunda alınan X-ray analiz sonuçları görülmektedir. Kontrol (%0 Psikoz) içeren örnekte beklenen şekilde pik sayısında yüksek oranda artış görülmüş ve piklerin daraldığı gözlenmiştir. Bu durum yüksek kristalinite ile ilişkilendirilebilir. Öte yandan %40 D-Psikoz içeren örneklerde kontrole göre oldukça az sayıda ve dar pikler gözlenmiştir. Bu durum proje taslağında da belirtilmiş olan D-Psikozun kristalizasyonu inhibe edici etkisi olduğu hipotezini destekler niteliktedir.

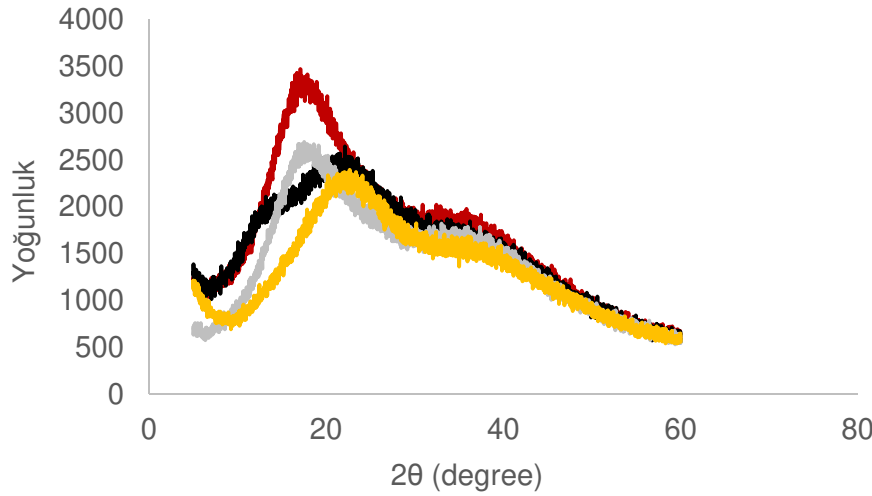


Şekil 38. %11 nişasta ve farklı şeker türleri ile hazırlanmış formülasyonların XRD spektrası 11_S0_R30(—) ve 11_S0_R0 (—) (a) 0.gün (b) 28. gün

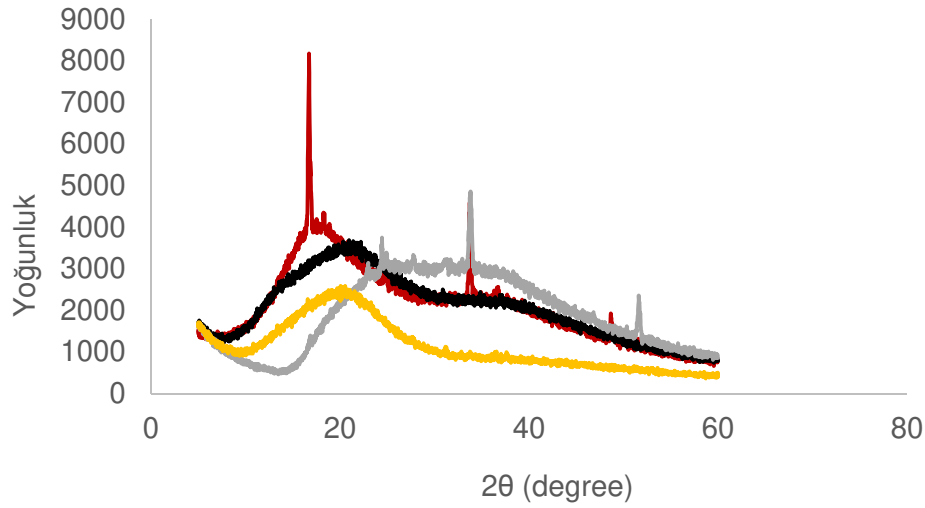


Şekil 39. %9 nişasta -%2 soy proteini ve farklı şeker türleri ile hazırlanmış formülasyonların XRD spektrası 9_S2_R30(—) ve 9_S2_R0 (—) (a) 0.gün (b) 28. gün

0.gün için %11 nişasta içeren sükroz kullanılarak hazırlanmış formülasyonlar daha yüksek yoğunlukta kırılmaya sebep olurken, D-Psikoz içeren formülasyon için daha düşük yoğunluk ve daha fazla sayıda pik gözlenmiştir. 28. Gün sonunda %11 nişasta içeren formülasyonlardan sükroz içeren numuneler daha yoğun kırılma ve daha fazla sayıda pik vermiştir (Şekil 38b - 39 b). Bunun yanında D-psikoz içeren numuneler daha geniş bir kırılma gösterirken daha az pik vermiştir. Nişasta granülleri için karakteristik kırılma 17.8°, 21.8°, and 24.1°, noktalarında tespit edilmiştir (Das vd., 2010; Nagaraj, Sasidharan, David, & Sambandam, 2017). Bu nedenle Şekillerde görülen 18°-22° arası değişen yüksek yoğunluklu pikler nişasta retrogradasyonu ile ilişkilendirilmiştir. 28. Gün sonunda yapılan ölçümlerde elde edilen veriler göstermektedir ki sükroz ve nişasta içeren formülasyonlar kristalizasyona daha yatkındır. Şekil 39a ve Şekil 39b incelendiğinde izole soya proteini içeren formülasyonlar D-psikoz varlığında, soya proteini içermeyenlere göre daha yüksek yoğunlukta daha keskin kırılma göstermiştir. Bu duruma d-psikoz varlığında artan Maillard reaksiyonları sonucu ortaya çıkan yüksek protein-protein veya protein-şeker kovalent çapraz bağlanması ve nişasta jel ağının zarar görmesi sonucu doğal halde kalan nişasta miktarının artması sebep olmuş olabilir.



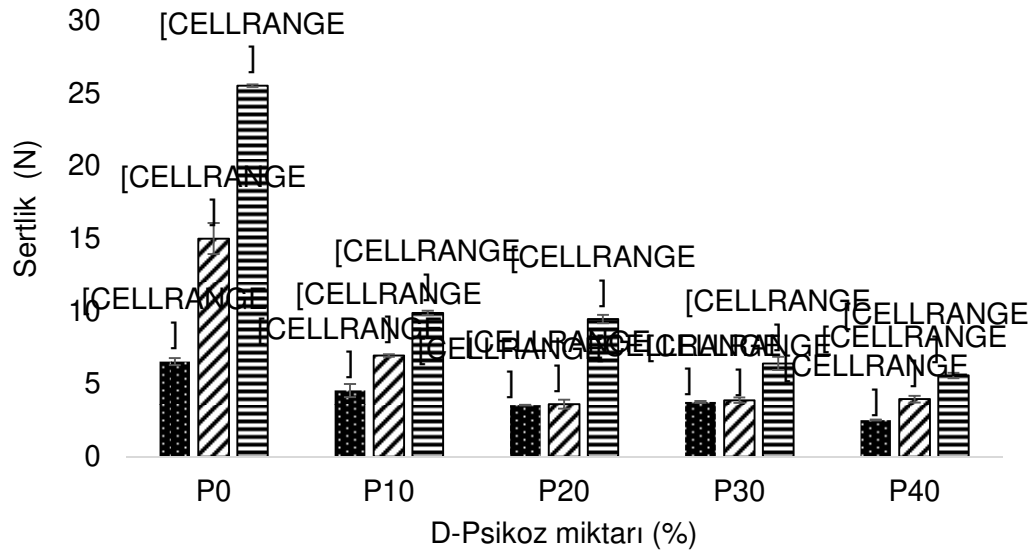
Şekil 40. Pektin bazlı yumuşak şekerlerin ilk güne ait X-Ray kırınım modeli S1_SA_035 (—) S0_SA_035(—), S1_SA_350 (—), S0_SA_350 (—)



Şekil 41. Pektin bazlı yumuşak şekerlerin 28. güne ait X-Ray kırınım modeli S1_SA_035 (—) S0_SA_035(—), S1_SA_350 (—), S0_SA_350 (—)

Sonuçlar başlangıçta pektin içeren tüm örneklerin amorf durumda olduğunu göstermiştir. 28 gün sonra, D-Allüloz içerenler kısmen kristalimsi bir davranış gösterirken sakkaroz içerenler sadece amorf davranış sergilemiştir. Bu beklenen bir sonuç değildir çünkü sakkarozun kristallenme yeteneğinin çok fazla olduğu (Chinachoti & Steinberg, 1986; Leinen & Labuza, 2006; Palmer, Dye, & Black, 1956) ve D-psikozun da kristallenmeyi önleyen bir eğilimi olduğu (Pocan et al., 2019) daha önceki literatür çalışmalarında görülmektedir. Bu farklılığın pektin içeren şekerlemelerin jel yapma mekanizmasının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha önceki bölümlerde de açıklandığı üzere, D-psikoz pektin jeli için ortamdaki suyu yeterli şekilde elimine edememiş ve daha zayıf bir jel yapısı oluşmasına neden olmuştur. Bundan dolayı, D-psikoz içeren şekerlemeler kolay kristallenirken, sakkaroz içeren şekerlemeler kristallenme eğilimi göstermemiştir.

4.2.1.4. Tekstür Profil Analizi Deneyleri (TPA)



Şekil 42. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin sertlik değerleri: ■ 0. Gün, ▨ 14. Gün, ▩ 21. Gün

Şekil 42’de depolama süresi boyunca farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin sertlik değerleri verilmiştir. Sadece sükröz içeren kontrol örneklerinde, 21 günün sonunda diğer örneklerle göre oldukça yüksek bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu sertlik artışı X-ray sonuçlarında da değinildiği gibi kristalinitenin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Formülasyonlarda D-Psikoze oranı artmasının ise sertliği genel olarak değiştirmedeği gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 16. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin sertlik değerleri

Sertlik (N)	Depolama süresi (gün)			
	0	10	20	30
11_S0_R0	06,08 ± 0,11 ^{cd,D}	19,54 ± 0,73 ^{b,C}	35,90 ± 2,14 ^{a,B}	46,40 ± 0,51 ^{a,A}
11_S0_R10	07,29 ± 0,53 ^{c,C}	25,32 ± 1,33 ^{a,B}	32,99 ± 4,10 ^{ab,AB}	39,06 ± 3,60 ^{b,A}
11_S0_R20	04,14 ± 0,73 ^{cd,C}	09,92 ± 0,87 ^{c,B}	13,23 ± 1,03 ^{cd,AB}	13,82 ± 0,67 ^{d,A}
11_S0_R30	02,58 ± 0,24 ^{d,C}	04,54 ± 0,17 ^{e,B}	05,83 ± 0,07 ^{d,A}	06,43 ± 0,20 ^{e,A}
9_S2_R0	23,92 ± 0,81 ^{a,B}	05,20 ± 0,51 ^{de,C}	41,89 ± 4,59 ^{a,A}	43,51 ± 0,79 ^{ab,A}
9_S2_R10	17,45 ± 2,82 ^{b,AB}	07,35 ± 0,20 ^{cd,B}	22,57 ± 5,71 ^{bc,A}	20,21 ± 1,84 ^{c,AB}
9_S2_R20	06,94 ± 0,15 ^{cd,AB}	04,17 ± 0,12 ^{e,B}	08,49 ± 0,89 ^{d,A}	08,54 ± 1,04 ^{de,A}
9_S2_R30	06,07 ± 0,57 ^{cd,AB}	03,73 ± 0,08 ^{e,B}	07,37 ± 0,51 ^{d,A}	06,76 ± 1,04 ^{e,A}

Küçük harfler, her sütun içindeki örnekler arasındaki, büyük harfler her satırdaki önemli farklılıkları belirtir

Tablo 16'da görüldüğü üzere, sertlik değerleri izole soya proteini eklenmesiyle artmıştır ($p<0,05$). İzole soya proteininin formülasyona eklenmesiyle ortamda bulunan indirgen şekerlerin proteinlerle tepkimeye girerek oluşturduğu kovalent çapraz bağlar, sertlik değerlerinin daha yüksek ölçülmesine neden olmuştur. Fakat 10. gün ölçümlerinde görülmektedir ki izole soya proteini içeren numuneler sadece nişasta ile hazırlanan numunelere göre kayda değer ölçüde düşüktür bu durum, 10 gün depolama sonunda protein varlığının sistemde kesikli faz oluşmasına sebep olduğunu buna bağlı olarak tekstürde azalmaya yol açtığı söylenebilir.

Bunun yanında, soya proteini içeren formülasyonların (9_S2_R0, 9_S2_R10, 9_S2_R20, 9_S2_R30) sertlik değerleri 20.güne kadar artmış sonrasında değişmeden kalmıştır ($p<0,05$). Artan sertlik değeri zarar görmüş jel ağı sebebiyle formülasyonların daha çok su kaybetmesine neden olmuş olabilir. Bu sonuç XRD sonuçlarıyla da desteklenmektedir.

Pektin içeren şekerlemelerin sertlik değerleri Tablo 17'de verilmiştir. Buna göre, soya protein içermeyen şekerlemelerde sertlik belli bir yüzdeye kadar artarken; sadece D-psikoz içeren şekerlemelerde sertlik değeri düşmüş ve sadece sakkaroz içeren şekerlemelerin sertlik değerine ulaşmıştır. Bu nedenle, sakkaroz ve D-psikoz içeren numunelerin sinerjistik etki gösterdiği ve sertliği yalnızca sükroz veya D-Psikoz içerenlerden daha fazla arttırdığı sonucuna varılmıştır. Sisteme soya proteini ilavesinin numunelerin sertliğini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu durum olası pektin-soya jelleşme mekanizmasıyla açıklanmaya çalışılmıştır. Sisteme soya proteini izolatu eklendiğinde, pektin ve soya proteini birbirleriyle etkileşime girmiş ve bir çapraz bağ oluşturmuştur. Bu yeni matris, pektin bazlı şekerlerin

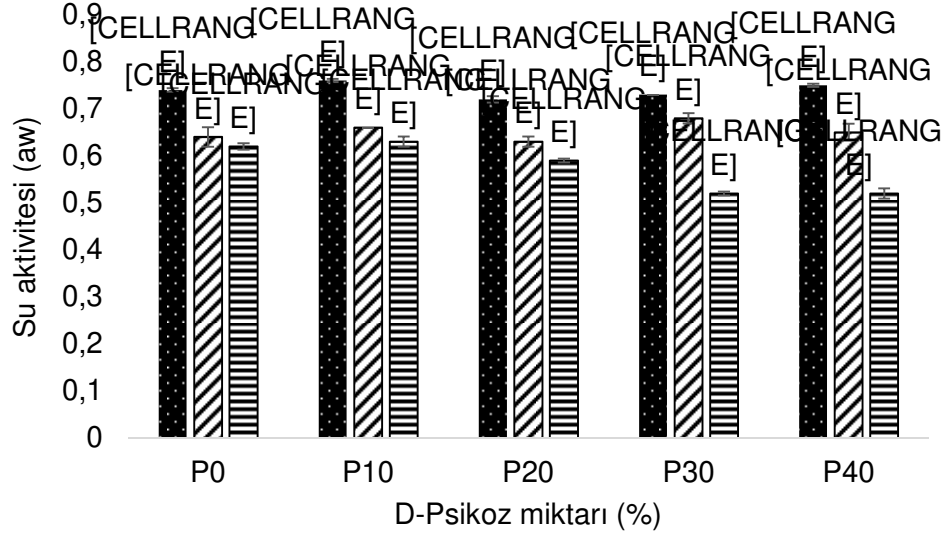
sertliğini arttırmış olabilir diye düşünülmektedir (Jaramillo, Roberts, & Coupland, 2011; Lam, Shen, Paulsen, & Corredig, 2007; Piazza, Dürr-Auster, Gigli, Windhab, & Fischer, 2009; Sessler, Weiss, & Vodovotz, 2013). Soya proteini içeren şekerlerin D-Psikoz konsantrasyonuna göre sertliği de incelenmiştir ve D-Psikoz ilavesinin şekerlerin sertlik değerlerini arttırdığı gözlenmiştir. D-Psikoz su bağlanmasında çok iyi olmadığından (Ikeda, Gohtani, Fukada, & Amo, 2011; Poca, İlhan, & Oztop, 2019) ve jel matrisinde pektinin jelleşme kabiliyetini de engelleyebilecek serbest su bulunmasına sebep olabileceğinden bu sonuç beklenenin aksine çıkmıştır. 2 saatlik mide sindiriminin ardından şekerlerin sertlik değeri genellikle azalma gözlemlenmiştir. Sindirim sırasında, şeker mide suyu içerisinde çözünür ve soya proteini mide suyunda sindirilir. Bunların bir sonucu olarak, jel yapısında zayıflık ve daha yumuşak jeller elde edilmiştir. Sadece sakaroz içeren şekerlemelerde jel yapısındaki zayıflama istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır. Bunun sebebi ise sakaroz, D-Psikozdan daha kompakt bir çapraz bağlantı yapısı oluşturduğu görülmektedir, çünkü D-Psikoz düşük su bağlama kapasitesi nedeniyle pektinin suyla etkileşime girmesine izin vermiştir. Yüksek Metoksilli pektin jel mekanizması göz önüne alındığında, sistemdeki suyu azaltmak amacıyla şeker ilave edilir, böylece genellikle zayıf jel yapısına yol açan olası pektin-su etkileşimi ortadan kaldırılmış olur. Ancak, D-Psikoz su tutma yeteneğinin daha düşük olmasından dolayı sistemdeki suyu ortadan kaldırmada sakkaroz kadar başarılı olamamış ve pektin jellerinin daha kolay dağılmasına izin vermiştir.

Tablo 17. Pektin jellerinin sindirim öncesi ve sonrası sertlik (N) değerleri

Sertlik (N)		
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası
S0_SA_035	11.65 ± 0.41 ^{d,A}	13.02 ± 1.21 ^{b,B}
S0_SA_1025	15.45 ± 1.22 ^{ab,A}	13.10 ± 0.75 ^{b,B}
S0_SA_2015	17.14 ± 0.76 ^{bc,A}	11.53 ± 0.75 ^{ab,B}
S0_SA_350	11.48 ± 0.11 ^{d,A}	12.36 ± 0.68 ^{b,A}
S1_SA_035	19.22 ± 0.66 ^{cd,A}	17.75 ± 0.39 ^{b,A}
S1_SA_1025	20.05 ± 0.43 ^{bc,A}	13.72 ± 0.40 ^{b,B}
S1_SA_2015	15.11 ± 0.46 ^{a,A}	9.74 ± 0.68 ^{b,B}
S1_SA_350	13.05 ± 1.08 ^{a,A}	11.48 ± 2.04 ^{a,A}

Küçük harfler, her sütun içindeki örnekler arasındaki önemli farkı gösterir (p <0.05)

4.2.1.5. Su aktivitesi (aw)



Şekil 43. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin su aktivitesi değerleri: ■ 0. Gün, ▨ 7. Gün, ▩ 14. Gün, ▪ 21. Gün

Şekil 43'te görüldüğü üzere, farklı formülasyonların su aktivitesinde büyük değişimler gözlenmemiş olup, sonuçların istatistiksel olarak benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$). 1 haftalık depolama süresi boyunca da tüm formülasyonların su aktiviteleri arasında değişim gözlenmemiştir. Ancak 14. Ve 21. Günde tüm örneklerin su aktivitelerinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Tüm formülasyonların su aktiviteleri incelendiğinde 0,52-0,76 arasında değiştiği gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, jel yapıda olan şekerlemelerin su aktivitelerinin genelde 0,5-0,75 arasında değiştiği belirtilmiştir (Ergun vd., 2017). Bu yüzden proje sonuçlarının literatürdeki çalışmalar ile de tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

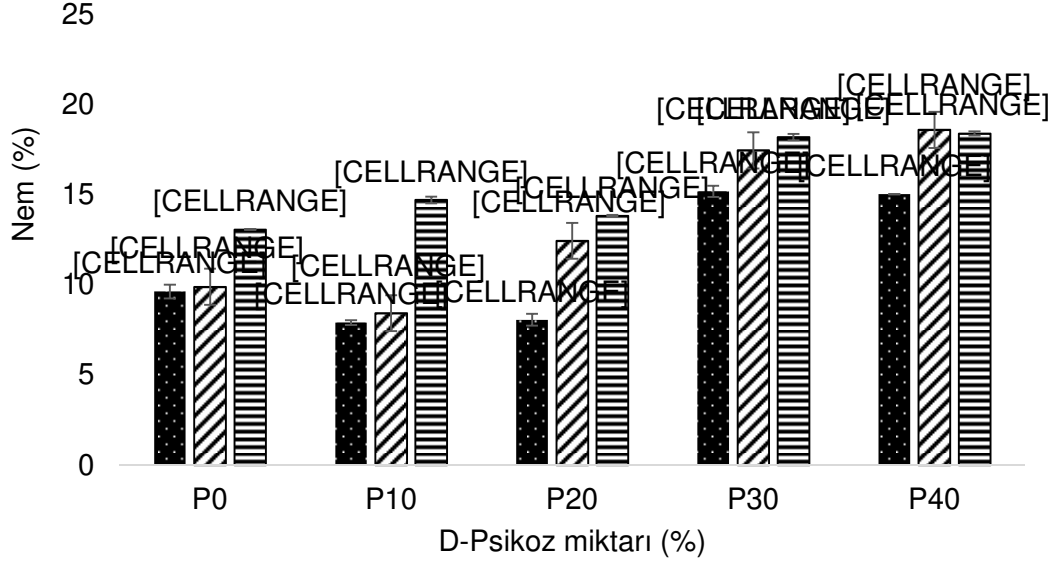
Tablo 18. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin su aktivitesi değerleri

aw	Depolama süresi (gün)				
	0	7	14	21	28
11_S0_R0	0,69 ± 0,00 ^{aA}	0,65 ± 0,01 ^{aAB}	0,64 ± 0,01 ^{aB}	0,66 ± 0,02 ^{aAB}	0,64 ± 0,00 ^{aB}
11_S0_R10	0,66 ± 0,00 ^{bA}	0,60 ± 0,00 ^{bC}	0,63 ± 0,01 ^{bB}	0,57 ± 0,00 ^{bD}	0,60 ± 0,01 ^{bC}
11_S0_R20	0,62 ± 0,01 ^{cA}	0,58 ± 0,01 ^{cAB}	0,61 ± 0,01 ^{cA}	0,56 ± 0,01 ^{cB}	0,58 ± 0,00 ^{cAB}
11_S0_R30	0,61 ± 0,01 ^{cA}	0,57 ± 0,00 ^{cB}	0,58 ± 0,02 ^{cAB}	0,55 ± 0,01 ^{cB}	0,58 ± 0,00 ^{cAB}
9_S2_R0	0,66 ± 0,00 ^{bA}	0,62 ± 0,01 ^{bAB}	0,62 ± 0,01 ^{bAB}	0,59 ± 0,04 ^{bB}	0,62 ± 0,01 ^{bAB}
9_S2_R10	0,57 ± 0,00 ^{dA}	0,55 ± 0,00 ^{dAB}	0,55 ± 0,01 ^{dAB}	0,52 ± 0,02 ^{dB}	0,56 ± 0,00 ^{dA}
9_S2_R20	0,57 ± 0,00 ^{dA}	0,55 ± 0,00 ^{dA}	0,57 ± 0,01 ^{dA}	0,53 ± 0,00 ^{dA}	0,56 ± 0,00 ^{dA}
9_S2_R30	0,54 ± 0,00 ^{eA}	0,53 ± 0,00 ^{eAB}	0,51 ± 0,02 ^{eAB}	0,51 ± 0,01 ^{eB}	0,54 ± 0,00 ^{eA}

Küçük harfler, her sütun içindeki örnekler arasındaki, büyük harfler her satırdaki önemli farklılıkları belirtir

Nişasta içeren şekerleme ürünlerinin 28 günlük depolama süresi boyunca değişen su aktivitesi değerleri Tablo 18’de verilmiştir ve izole soya proteini eklenmesiyle su aktivitesinde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bunun yanında D-psikoz kullanılması da su aktivitesini düşürücü etki göstermiştir ($p<0,05$). Literatürde D-psikozun nişasta jelatinizasyonu için daha çok su sağladığı bu sayede daha iyi bir jel ağı oluşturduğundan bahsedilmiştir (Ikeda, Gohtani, Fukada, & Amo, 2011; Yuanxia Sun, Hayakawa, Ogawa, & Izumori, 2007). Ayrıca aminoasit varlığında artan Maillard reaksiyonlarının jel ağını destekleyici etkisinden bahseden çalışmalar vardır (Y. Sun, Hayakawa, & Izumori, 2004). Bu nedenle, izole soya proteini ve D-psikoz beraber kullanılmasının formülasyonlarda daha düşük su aktivitesi göstermesi, daha güçlü bir jel ağının oluşmasıyla açıklanmıştır. Bunun yanı sıra, su aktivitesindeki azalma nadir şekerin retrogradasyonu ve buna bağlı sinerisi geciktirmesi ile de açıklanabilir.

4.2.1.6. Nem İçeriği (%)



Şekil 44: Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin nem (%) değerleri: ■ 0. Gün, ▨ 7. Gün, ▩ 14. Gün, ▪ 21. Gün

0. gün örnekleri için %30 ve %40 D-Psikoze kullanıldığında nem miktarının büyük ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bu da D-Psikozun sükroza göre yüksek nem tutma kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir. Tekstür kısmında da anlatıldığı gibi, yüksek oranda D-Psikoze içeren örneklerdeki sertliğin düşme sebebi artan nem miktarıyla ilişkilendirilmiştir.

Tablo 19. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin nem içeriği değerleri

Mc (%)	Depolama süresi (gün)				
	0	7	14	21	28
11_S0_R0	14,94 ± 0,01 ^{ab,A}	13,01 ± 2,20 ^{a,A}	13,24 ± 0,32 ^{a,A}	12,63 ± 0,62 ^{ab,A}	12,32 ± 0,67 ^{a,A}
11_S0_R10	15,20 ± 0,20 ^{a,A}	14,67 ± 0,03 ^{a,A}	11,82 ± 0,90 ^{a,B}	12,22 ± 0,16 ^{ab,B}	11,31 ± 0,09 ^{a,B}
11_S0_R20	15,44 ± 1,83 ^{a,A}	13,70 ± 0,90 ^{a,A}	12,53 ± 0,29 ^{a,A}	11,97 ± 0,04 ^{ab,A}	12,52 ± 0,34 ^{a,A}
11_S0_R30	13,85 ± 0,07 ^{abc,AB}	14,43 ± 0,15 ^{a,A}	12,52 ± 0,04 ^{a,C}	12,48 ± 0,41 ^{ab,C}	13,15 ± 0,46 ^{a,BC}
9_S2_R0	14,09 ± 0,01 ^{abc,A}	14,37 ± 0,62 ^{a,A}	12,95 ± 0,90 ^{a,AB}	13,24 ± 0,50 ^{a,AB}	11,65 ± 0,63 ^{a,B}
9_S2_R10	12,44 ± 0,12 ^{bc,AB}	14,86 ± 1,82 ^{a,A}	12,23 ± 0,72 ^{a,AB}	11,11 ± 0,63 ^{b,B}	11,39 ± 0,18 ^{a,AB}
9_S2_R20	12,41 ± 0,06 ^{bc,AB}	13,68 ± 0,49 ^{a,A}	12,16 ± 0,04 ^{a,B}	11,72 ± 0,24 ^{ab,B}	12,09 ± 0,46 ^{a,B}
9_S2_R30	12,05 ± 0,00 ^{c,A}	12,72 ± 0,29 ^{a,A}	11,48 ± 0,06 ^{a,A}	11,59 ± 0,25 ^{b,A}	12,30 ± 1,72 ^{a,A}

Küçük harfler, her sütun içindeki örnekler arasındaki, büyük harfler her satırdaki önemli farklılıkları belirtir

Nem içeriği ürünlerin final tekstür ve raf ömrünü etkileyen bir parametredir. Yapılan deneyler sonucunda hazırlanan bütün formülasyonların nem içeriği literatürde belirtilen sınırlar dahilinde % 11-15.4 aralığında ölçülmüştür (Ergun vd., 2010). Tablo 19'da 28 günlük depolama sonucunda elde edilen sonuçlar verilmiştir. İzole soya proteini ve D-psikozun beraber kullanıldığı formülasyonlarda nem içeriğinin kayda değer biçimde düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Daha önce de belirtildiği gibi protein varlığında nişasta tamamıyla jelleşme gösterememekte bu da pişirme süresinde suyun buharlaşmasının da yardımıyla son üründe jel ağı içinde daha az su bulunmasına neden olmuş olabilir.

Soya proteini içermeyen şekerlemelerde, D-Psikoz oranı arttıkça şekerlerin nem oranının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu, D-Allüloz numunelerinin düşük su bağlama kapasitesi nedeniyle sistemde daha fazla serbest suya sahip olduğu ve şeker yapma işlemi sırasında, D-Allüloz içeren şekerlerden sakkaroz içerenlere göre daha fazla su buharlaşmış olabileceği ile açıklanabilir. Bu da artan D-Allüloz konsantrasyonu ile daha düşük nem içeriğine neden olmuştur. Soya proteini içeren şekerlemelerde ise, soya proteini ilavesi, tüm D-Allüloz konsantrasyonlarında nem içeriğinde artışa neden olmuştur. Bu sonuç şaşırtıcı bulunmamıştır, çünkü proteinler suyu emip şişdikçe, suyu yoğun bir şekilde bağlama yeteneğine sahiptirler (Jideani, 2012). Bu durum da nem miktarında artışa neden olmuştur. Ayrıca, soya proteini içeren şekerlemelerde, sadece sakkaroz içeren şekerlerin sadece D-psikoz içeren şekerlemelere göre daha düşük nem miktarına sahip olduğu görülmüştür. 2 saatlik mide sindiriminden sonra, tüm numuneler için şekerler için nem içeriğinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Yüksek Metoksilli Pektin jellerinin yapısı şekere kuvvetli bir şekilde bağlı olduğu için, şekerin çözünmesi jel yapısını gevşetmiş ve yapıya daha fazla su nüfuz etmesine sebep olmuştur. Bu nedenle, şekerlerin nem içeriği artmıştır.

Tablo 20. Pektin jellerinin sindirim öncesi ve sonrası nem miktarı

	Nem Miktarı (%)	
	Sindirim Öncesi	Sindirim Sonrası
S0_SA_035	9.467 ± 0.005 ^{e,A}	10.767 ± 0.011 ^{d,A}
S0_SA_1025	7.853 ± 0.008 ^{e,A}	12.3211 ± 0.002 ^{cd,B}
S0_SA_2015	9.796 ± 0.011 ^{de,A}	15.0034 ± 0.008 ^{bc,B}
S0_SA_350	11.713 ± 0.005 ^{cd,A}	17.3577 ± 0.016 ^{ab,B}
S1_SA_035	15.141 ± 0.009 ^{a,A}	17.7099 ± 0.003 ^{ab,B}
S1_SA_1025	14.370 ± 0.005 ^{ab,A}	16.5132 ± 0.019 ^{ab,B}
S1_SA_2015	14.904 ± 0.005 ^{a,A}	19.0332 ± 0.007 ^{a,B}
S1_SA_350	12.845 ± 0.004 ^{bc,A}	15.8796 ± 0.001 ^{abc,B}

Küçük harfler, her sütun içindeki örnekler arasındaki, büyük harfler her satırdaki önemli farklılıkları belirtir

4.2.1.7. Renk Ölçümü

Tablo 21. Farklı formülasyona sahip jelatin içeren şekerlemelerin parlaklık (L), sarılık (b) ve kırmızılık (a) değerleri

	L*	a*	b*
Kontrol (0%)	52±0.35 ^a	-0.27±0.0035 ^c	12.49±0.09 ^d
10%	49.56±0.095 ^b	-0.33±0.018 ^c	13.9±0.004 ^c
20%	48.96±0.092 ^b	0.11±0 ^b	14.37±0.014 ^{bc}
30%	49.22±0.35 ^b	0.13±0.005 ^b	14.48±0.11 ^b
40%	50.42±0.06 ^{ab}	0.31±0.007 ^a	17.66±0.028 ^a

Tablo 21’de görüldüğü üzere D-Psikoz oranı arttıkça Parlaklık (L) değerlerinin azalırken sarılık (b) değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Nadir heksozların aminlerle daha hızlı reaksiyona girerek yoğunlaşma reaksiyonlarını hızlandırdığı bilinmektedir (Yuanxia Sun, Hayakawa, Puangmanee, & Izumori, 2006). Bu çalışmada da jelatin içeren şekerlemelerde artan oranlarda D-Psikoz kullanılması jelatin-şeker arasında oluşan Maillard reaksiyonlarını

hızlandırarak sarılık değerlerini önemli ölçüde artırdığı, parlaklık değerlerini ise azalttığı gözlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 22. Farklı formülasyona sahip nişasta içeren şekerlemelerin parlaklık (L), sarılık (b) ve kırmızılık (a) değerleri

	L*	a*	b*
11_S0_R0	60,52 \pm 0,13 ^a	0,00 \pm 0,00 ^e	08,37 \pm 0,11 ^{de}
11_S0_R10	60,39 \pm 1,72 ^a	0,10 \pm 0,01 ^e	15,63 \pm 1,63 ^c
11_S0_R20	58,74 \pm 1,49 ^a	1,67 \pm 0,11 ^d	19,23 \pm 0,93 ^b
11_S0_R30	58,29 \pm 1,73 ^a	5,18 \pm 0,25 ^c	23,04 \pm 1,56 ^a
9_S2_R0	48,02 \pm 0,40 ^b	7,23 \pm 0,44 ^b	09,17 \pm 0,06 ^d
9_S2_R10	46,72 \pm 0,86 ^b	8,58 \pm 0,38 ^a	09,36 \pm 0,16 ^d
9_S2_R20	44,07 \pm 1,51 ^b	5,09 \pm 0,17 ^c	04,62 \pm 0,07 ^f
9_S2_R30	46,70 \pm 0,02 ^b	5,45 \pm 0,35 ^c	05,27 \pm 0,31 ^{ef}

Tablo 22’de görüldüğü üzere, parlaklık değeri (L*) D-psikoz kullanılmasıyla önemli ölçüde bir değişikliğe uğramazken ($p>0,05$). İzole soya proteini yer değiştirmesi ile önemli ölçüde değişmiştir ($p<0,05$). Soya proteini eklenmesiyle artan kırmızılık (a*), azalan sarılık (b*) ve parlaklık kaybı formülasyonların daha kahverengi olduğunu göstermektedir (Yuanxia Sun, Hayakawa, Ogawa, Fukada, & Izumori, 2008). Daha kahverengi ürünler elde edilmesinin sebebi D-psikoz varlığında artan Maillard reaksiyonları ile açıklanmıştır.

Tablo 23’te pektin jellerine ait renk değerleri verilmiştir. Renk sonuçlarına bakıldığında açıkça D-psikozun konsantrasyonu arttıkça, açıklık değerlerinin (L *) azaldığını ve ayrıca tüm soya proteini izolatu konsantrasyonları için kırmızılık/yeşillik göstergesi olan a* değerinin önemli şekilde arttığını göstermiştir. D-psikoz içeren şekerlerin, sakkaroz içeren şekerlerden daha koyu ve daha kırmızı olduğu görülmüştür. Bu durum, D-psikozun, Maillard Browning reaksiyonlarına katılma eğilimi sakkarozdan daha fazla olmasıyla açıklanmaktadır (O’Charoen, Hayakawa, Matsumoto, & Ogawa, 2014; Sun, Hayakawa, Ogawa, Fukada, & Izumori, 2008). Soya proteini içermeyen şekerlemelerde ortama amin grubu sağlanamamasına rağmen D-psikoz içeren şekerlemelerde yine de kırmızılık/yeşillik göstergesi a* değerinin daha yüksek olduğu, açıklık değerinin ise daha düşük olduğu görülmüştür. Bu, karamelizasyon reaksiyonları ile açıklanabilir. ΔE değerleri karşılaştırıldığında ise, ΔE ne kadar büyükse, renkler arasındaki farkın o kadar büyük olduğu anlamına gelmektedir. (Mennah-Govela & Bornhorst, 2017; Özcan, 2008). ΔE değeri S0_SA_350 örneği baz alınarak hesaplanmıştır. D-psikoz içeren şekerlemelerin en yüksek

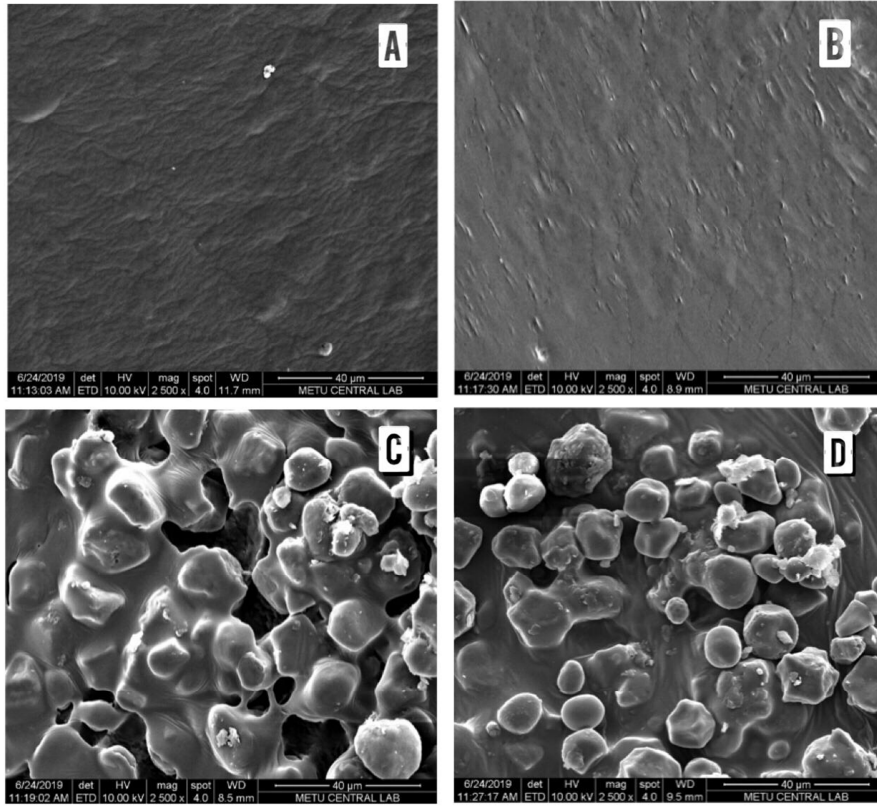
ΔE değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu da sakkaroz ve D-psikoz içeren şekerlemelerin birbirlerinden kolayca ayırt edilebileceği anlamına gelmektedir.

Tablo 23. CIE Lab renk sistemi sabitleri

	L*	a*	b*	ΔE
S0_SA_035	45.31±0.08 ^d	1.04±0.01 ^a	11.38±0.03 ^a	11.19±0.08 ^c
S0_SA_1025	44.54±0.20 ^e	0.86±0.01 ^b	6.36±0.05 ^b	12.05±0.20 ^{ab}
S0_SA_2015	47.41±0.01 ^c	0.26±0.01 ^g	12.88±0.04 ^c	9.58±0.03 ^d
S0_SA_350	56.24±0.16 ^a	0.11±0.01 ^g	9.16±0.01 ^f	-
S1_SA_035	47.35±0.25 ^c	5.81±0.11 ^c	14.32±0.35 ^d	11.75±0.39 ^{bc}
S1_SA_1025	47.92±0.08 ^c	4.50±0.02 ^d	9.21±0.06 ^f	9.40±0.09 ^d
S1_SA_2015	45.415±0.15 ^d	4.94±0.04 ^e	13.42±0.11 ^e	12.59±0.17 ^a
S1_SA_350	52.68±0.16 ^b	1.72±0.01 ^f	10.31±0.01 ^g	4.07±0.13 ^e

4.2.1.8. Taramalı Elektron Mikroskopisi

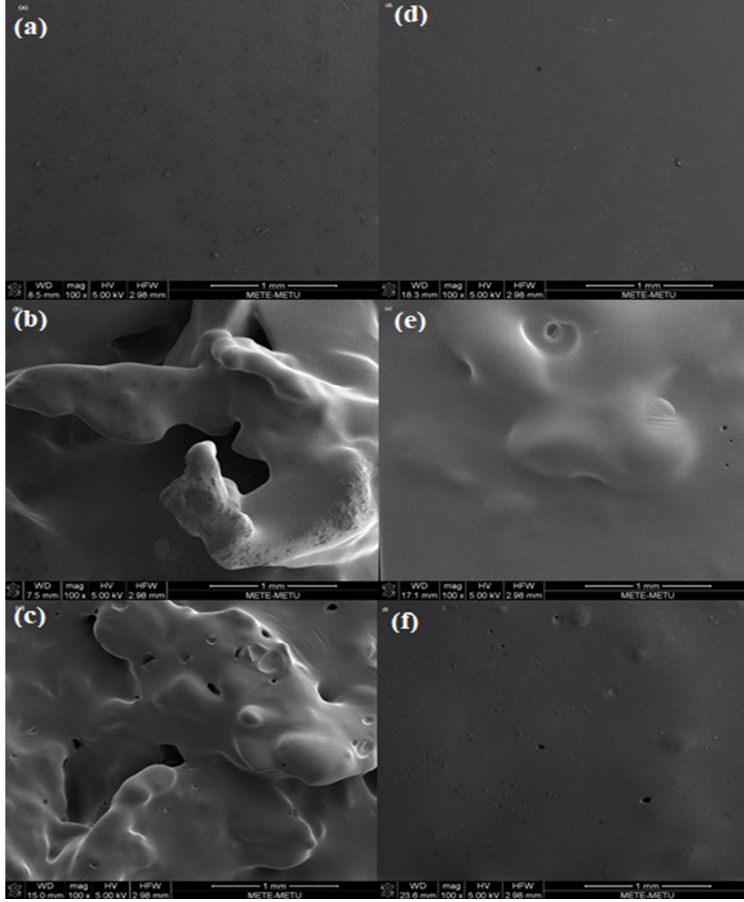
Taramalı elektron mikroskopisi (TEM), formülasyonların mikroyapı ve yüzey özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Elde edilen görüntüler, jelleşmeye ve faz ayrılmasında delil olarak kullanılabilecek morfoloji hakkında bilgi vermektedir. Şekil 45'te görülebileceği gibi, SPI ilavesinin formülasyonların mikroyapıları üzerinde önemli bir etkisi olmuştur. Sadece nişasta içeren formülasyonlar için pürüzsüz yüzeyler gözlemlenirken (Şekil 45 (a) - (b)), SPI'nin sunmuş olduğu partiküllerin şekli, çatlaklı fragmanlar halinde şekil ve büyüklükte değişmiştir (Şekil 45 (c) - (d)). Bu parçalanma ve çatlaklar, SPI'nin sisteme girmesiyle faz ayrılması hakkındaki hipotezi desteklemektedir. Ayrıca, boyut ve şekil bakımından değişken olan partiküller, literatürde belirtildiği gibi düşük konsantrasyonda kullanıldığında, jelleşmeden ziyade SPI'nin pıhtılaşmasının bir göstergesi olabilir (Puppo ve Añón, 1999).



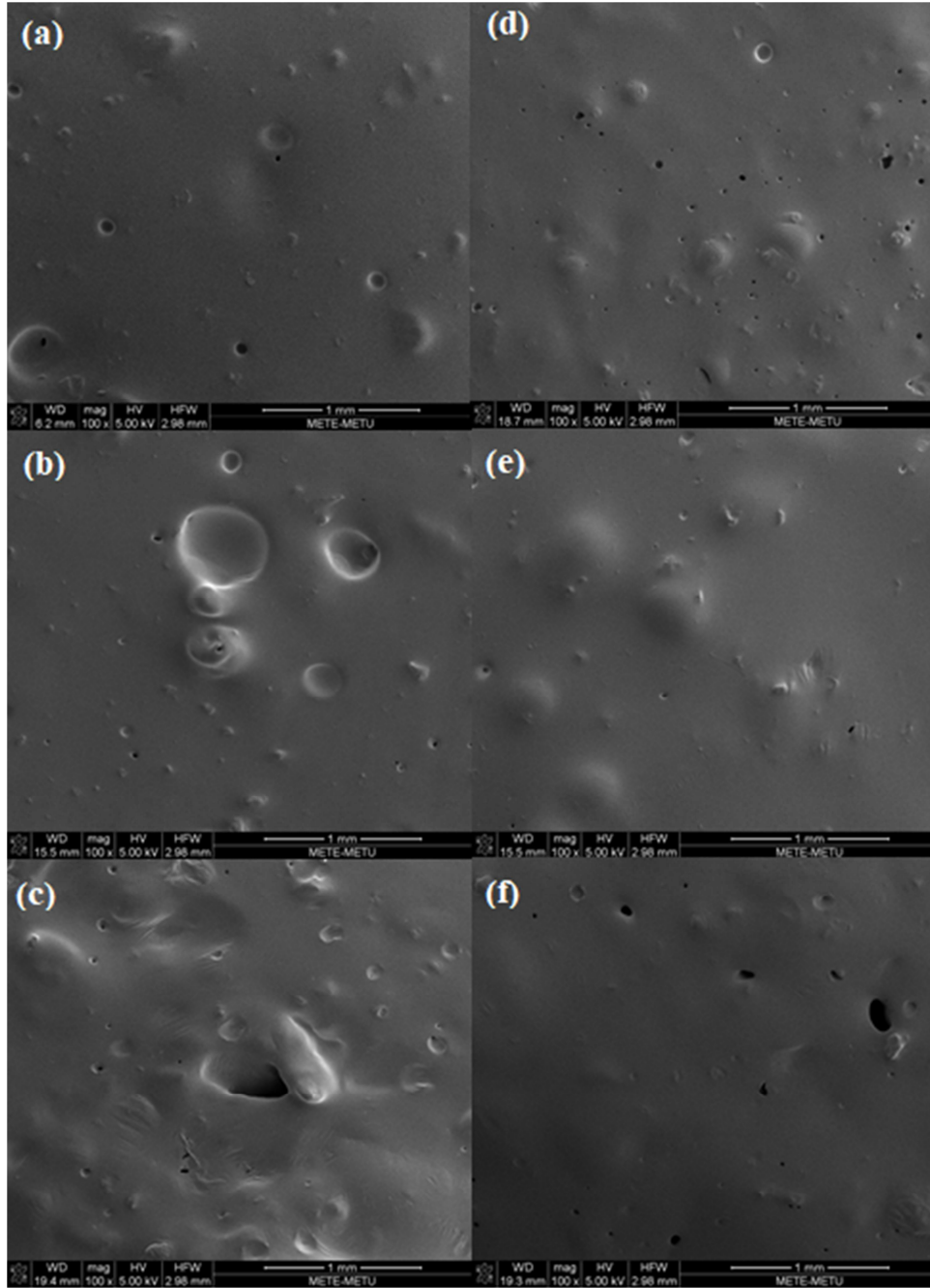
Şekil 45. nişasta içeren formülasyonların TEM görüntüleri (A) 11_S0_R0 (B) 11_S0_R30 (C) 9_S2_R0 (D) 9_S2_R30

Şekil 46, soya protein içermeyen şekerler için sindirim ve şeker tipinin etkisini gösterirken, Şekil 47, % 1'lik soya proteini içeren şekerleri göstermektedir. D-psikozlu numuneler daha düzgün bir yüzeye sahip olurken, sakkarozlu jel örneklerinin daha dallı ve pürüzlü bir yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. D-psikozun ve sakkarozun birlikte kullanıldığı konsantrasyonlarda da dallanmış bir yapının görülmesi, sakkarozun bu morfolojiden sorumlu madde olduğunu ve D-psikozun etkisini bastırdığını göstermektedir. Sisteme soya ilavesi de daha pürüzsüz bir yüzeye neden olmuştur, ancak yüzey üzerinde yeni delikler tespit edilmiştir. Bu durum da soya proteininin köpürme kabiliyeti ile açıklanabilir (Shao & Kao, 2014). Bu kabiliyetten dolayı kabarcıklar oluşmuş ve pişirme sonrası 24 saat boyunca çapraz bağlar oluşurken, bu kabarcıklar yüzeye çıkmış ve delikli yapıya neden olmuştur. 2 saatlik sindirimden sonra, SEM görüntüleri, hem soya olmayan hem de % 1 soya proteini içeren şekerler için daha yumuşak bir yüzeye sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum pektin jellerinin yapısının bozulmasıyla açıklanabilir. Şeker erimiş ve pektin jelinin bağ yapısı bozulmuştur. Ayrıca soya proteini de mide ortamında sindirilmiştir. Fakat, 2 saatlik

sindirimden sonra bile yüzey üzerinde hala delikler görülmektedir. Bu da soya proteininin tamamen sindirilmediğine gösteriyor olabilir.



Şekil 46. Soya proteini içermeyen şekerlemelerin taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri (a)SA_0/35 (b)SA_10/25 (c)35/0 (d)-(f)sırasıyla sindirim sonrası SEM görüntüleri



Şekil 47. %1 Soya proteini içeren şekerlemelerin taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri (a)SA_0/35 (b)SA_10/25 (c)35/0 (d)-(f)sırasıyla sindirim sonrası SEM görüntüleri

4.2.2. Duyusal Analizler

Çalışmanın bu kısmında pectin ve nişasta içeren formülasyonlar duyu analize tabi tutulmuştur. Çalışmada 12 eğitimli panelist kullanılmıştır. Yaş aralığı 20-39'dur. Testin ilk

aşamasında (ürün değerlendirmelerinden önce) panelistlerin şekerli ürünleri tüketme sıklığı, ardından protein katkılı ürünler ile kalorisi azaltılmış ürünleri özellikle tercih edip etmeyecekleri sorulmuştur. Panelistlerin %85'i haftada birkaç gün, %15'i ayda birkaç kere şekerli ürün tükettiklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda %65'i protein katkılı ürünleri özellikle tercih ettiğini belirtirken; %70'i kalorisi azaltılmış ürünleri özellikle tercih etmediğini belirtmiştir.

Ürünler panel öncesinde rastgele seçilmiş 3 basamaklı rakamlar ile kodlanmıştır. Her bir paneliste bir ağız dolusu büyüklüğünde numune porsiyonlanmış şekilde sunum yapılmıştır. Pektin içeren numuneler 12 eşit parçaya; nişasta içerenler ise 8 eşit parçaya bölünebilmiştir. Panelistler her bir ürün tadımından sonra 5 dakika ara vererek sonraki numuneyi değerlendirmişlerdir. Her numune geçişinde aralarda su içmeleri sağlanmıştır. Değerlendirmelerde kullanılan form ekte yer almaktadır. Ürün kod bilgileri aşağıdaki gibidir.

Tablo 24. Duyusal analiz sırasında kullanılan ürün kod bilgileri

Kod	Formülasyon ismi
432	11_S0_R0
733	11_S0_R30
502	9_S2_R0
196	9_S2_R30
618	S1_SA_035
275	S0_SA_035
324	S1_SA_350
916	S0_SA_350

Panelistlere her bir numuneyi tüketip tüketmeyecekleri sorulmuş, ayrıca tüketip tüketmeme nedenlerini belirtmeleri istenmiştir. Ürün bazında alınan yanıtlar aşağıdaki tabloda görülmektedir.

Tablo 25. Nişasta ve sükroz içeren formülasyon duyusal analiz sonucu

Ürün kodu: 432 (Sample 1)	
Tercih durumu	Tercih nedeni
Tercih ederim: %0	
Tercih etmem: %100	Tatlılık çok zayıf, algılanmıyor
	Hiçbir tat algılayamadım
	Tatlılık çok zayıf, tekstür başarısız
	Ürün dişlere yapışıyor

Tablo 26. Nişasta ve D-psikoz içeren formülasyon duyu analizi sonucu

Ürün kodu: 733 (Sample 2)	
<i>Tercih durumu</i>	<i>Tercih nedeni</i>
Tercih ederim: %12,5	Lezzeti dengeli buldum
Tercih etmem: %87,5	Çok yapışkan
	Aşırı yapışkan, tatlılık hissedilmiyor
	Çok sert, emilmesi çok zor
	Tatlılık çok çok az ve çok yumuşak

Tablo 27. Nişasta –İzole soya proteini ve sükröz içeren formülasyon duyu analizi

Ürün kodu: 502 (Sample 3)	
<i>Tercih durumu</i>	<i>Tercih nedeni</i>
Tercih ederim: %12,5	Lezzeti zayıf ama tüketebilirim
Tercih etmem: %87,5	Ağızda erimiyor, çok yapışkan
	Tekstür kötü, yapışkanlık çok fazla
	Çok yapışkan, tatlılık çok zayıf ve sert
	Tatlılık algılanmıyor
	İnanılmaz sert

Tablo 28. Nişasta –İzole soya proteini ve D-psikoz içeren formülasyon duyu analizi

Ürün kodu: 196 (Sample 4)	
<i>Tercih durumu</i>	<i>Tercih nedeni</i>
Tercih ederim: %0	
Tercih etmem: %100	Tatlılık çok zayıf, biraz daha güçlü olmasını tercih ederim
	Hiçbir tat algılayamadım
	Tatlılık çok az, tekstür başarısız
	Ürünü yiyebilmek çok zor, dişlere yapışıyor

Tablo 29. Pektin-İzole Soya Proteini ve D-psikoz içeren formülasyon duyu analizi

Ürün kodu: 618 (Sample A)	
<i>Tercih durumu</i>	<i>Tercih nedeni</i>
Tercih ederim: %25	Ekşilik baskın ama lezzetli
	Ekşilik&tatlılık dengesini beğendim.
	Lezzet bütünlüğünü sevdim.
Tercih etmem: %75	Kıvam çok kötü, ekşilik çok fazla hissediliyor
	Çok asidik, tatlılık algısı hiç yok, sadece tekstür fena değil, yapışkanlık az
	Çok ekşi
	Tekstür ve lezzet algısı kötü
	Kokusunu rahatsız edici buldum.
	Tatlı&ekşi dengesini uyumlu bulmadım

Tablo 30. Pektin ve D-psikoz içeren formülasyon duyu analizi

Ürün kodu: 275 (Sample B)	
Tercih durumu	Tercih nedeni
Tercih ederim: %17	Ekşilik fazla ama yakıştırdım
	Az tatlı seven biri olarak tercih ederim.
Tercih etmem: %83	Çok ekşi, yapısı hoş değil
	Oldukça asidik, şeker algısı çok zayıf, tekstürü güzel, dişlere yapışmıyor
	Ağızda tatlılık hissi çok zayıf
	Ekşi ve tatlılığı az. Ağızda dağılması çok güzel
	Tatlılık çok zayıf
	Çok ekşi, hızlı dağılıyor
	Ağızda çok hızlı dağılıyor, çok ekşi

Tablo 31. Pektin-İzole Soya Proteini ve sükröz içeren formülasyon duyu analizi

Ürün kodu: 324 (Sample C)	
Tercih durumu	Tercih nedeni
Tercih ederim: %40	Tatlılık ve tekstür gayet güzel, yapışkanlık biraz fazla
	Tatlılık çok az, ekşilik baskın ama sevdim
	Dokusu hafif pütürlü ve sert ancak tatlı&ekşi dengesini sevdim
Tercih etmem: %60	Rahatsız edici bir tadı var, ekşilik çok fazla
	Çok sert
	Fazla ekşi, kokusu kötü
	Lezzet güzel ancak çok sert

Tablo 32. Pektin ve sükröz içeren formülasyon duyu analizi

Ürün kodu: 916 (Sample D)	
Tercih durumu	Tercih nedeni
Tercih ederim: %60	Tekstür güzel, yapışkanlık fazla ancak tatlılık gayet güzel
	Şekeri düşük, ekşilik önde ancak tercih ederim
	Limonumsu, ekşi lezzette, yapı güzel
	Ağızda dağılımı güzel, ekşilik mayhoş ama güzel
	Çok citrus ancak keyifli
Tercih etmem: %40	Ekşilik ve asitlik çok rahatsız edici
	Ekşilik boğazı çok yakıyor

5. SONUÇ

Yürütülen bu çalışma 2 ana kısımdan oluşmuştur. Birincisi soya proteininin nadir şeker kullanılarak glikasyonu ve glike edilen proteinlerin özelliklerinin incelenmesi. İkincisi ise soya proteini glike olmuş soya proteini, d-psikozü, nişasta veya pektin içeren yumuşak şekerlemelerin tasarlanması, karakterizasyonu , depolama çalışması yapılmasıdır.

Yapılan çalışmalarla, glikasyon türü (Dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma), pH (7,10), şeker tipi (dekstroz, fruktoz ve D-Psicose) ve protein: şeker oranı (1:1, 2:1, 3:1, 5:1 ve 10:1) gibi farklı parametrelerin etkilerinin soya proteininin glikasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Numuneler bu şartlarda bulundurulduktan sonra, ayrıntılı bir fiziksel ve kimyasal karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Hem DPPH hem de CUPRAC testi ile antioksidan aktivitesi, glikasyon derecesi, Lowry Metodu ile çözünürlük, OPA Metodu ile serbest amino grubu, DNS Metodu ile şeker miktarı ve FTIR analizi gibi bazı deneyler yapılmıştır. Ayrıca NMR Relaxometry ile hidrasyon davranışı incelenmiştir. Tüm parametreler istatistiksel analizde değerlendirildiğinde, en yüksek glikasyon oranına sahip en iyi kombinasyonun pH 7 tampon çözeltisi ile hazırlanmış ve dondurularak kurutulmuş 1: 1 soya proteini : şeker oranına sahip numuneler olduğu anlaşılmıştır. Şeker tipleri arasında, dekstroz numunelerinde en düşük glikasyon gözlemlenmiştir. Ek olarak, D-Psicose, glikasyon reaksiyonlarında iyi bir alternatif şeker kaynağı olarak kabul edilmiştir ve hidrasyon davranışı göz önünde bulundurularak glikasyon oranını belirlemek için NMR Relaksometri'nin kullanılabileceği görülmüştür.

Şekerlemelerin tasarlanması ve karakterizasyonu süresince, kullanılan her jelleştirme ajanının D-psikoz etkileşimin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Jelatin ve nişasta kullanarak formüle edilmiş numunelerde, D-psikoz eklenmesi daha iyi bir jel yapısı oluşturur, ve bu jel matriks depolama süresince daha iyi korunabilirken, pektin içeren formülasyonlar D-psikoz eklenmesiyle daha zayıf bir jel yapısı oluşturmuştur. En belirgin farklılık X-ray kırınım sonuçlarında ortaya çıkmaktadır. Nişasta ve jelatin ile formüle edilmiş numuneler içinde sükröz içerenlerin 28. Gün sonunda daha kristallenmeye yatkın oldukları ve D-psikozun kristalizasyonu inhibe edici etkisi gözlemlenirken, pektin içeren numunelerde D-psikoz kullanılması kristallizasyonu artırıcı etki göstermiştir. Bunun yanı sıra, D-psikozun Maillard reaksiyonunu artırıcı etkisi bütün formülasyonlarda renk değişimleriyle gözlemlenmiştir.

Çalışmanın en önemli çıktılarından biri de NMR Relaksometrinin şekerleme ürünlerinin kalitesi hakkında bilgi edinilmeyi mümkün kılmasıdır. Elde edilen relaksasyon sürelerindeki

farklılık, ve spektrumlardaki değişen pik ve göreli alanlar, zamanla numunedeki değişimi izlemek ve numunenin kalitesini belirlemek için diğer yöntemlere alternatif olarak kullanılabilir.

Duyusal analiz sonuçlarına göre, numunelerin tatlılığı panelistlerin oğunlugu tarafından yeterli bulunmamıştır. D-psikoz kullanımının ekonomik yönleri de göz önünde bulundurarak, şekerleme endüstrisinde nadir şekerlerin kullanımını artırmak için optimizasyon çalışmaları gerekli olabilir.

KAYNAKÇA

- Amin, S.; Barnett, G. V.; Pathak, J. A.; Roberts, C. J.; Sarangapani, P. S. Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2014, 19 (5) 438– 449 DOI: 10.1016/j.cocis.2014.10.002
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(26), 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Aroulmoji, V., Mathlouthi, M., Feruglio, L., Murano, E., & Grassi, M. (2011). Hydration properties and proton exchange in aqueous sugar solutions studied by time domain nuclear magnetic resonance. Food Chemistry, 132(4), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.110>
- Beleia, A., Miller, R. A., & Hosney, R. C. (1996). Starch Gelatinization in Sugar Solutions. Starch/Stärke, 48(7–8), 259–262. <https://doi.org/10.1002/star.19960480705>
- Brown, J. G. (1966). Diffraction of X-rays. İçinde X-Rays and Their Applications (ss. 95–121). https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4398-1_6
- Burey, P., Bhandari, B. R., Rutgers, R. P. G., Halley, P. J., & Torley, P. J. (2009). Confectionery Gels: A Review on Formulation, Rheological and Structural Aspects. International Journal of Food Properties (C. 12). <https://doi.org/10.1080/10942910802223404>
- Chinachoti, P., & Steinberg, M. P. (1986). Crystallinity of sucrose by X-Ray Diffraction as Influenced by Absorption versus Desorption Waxy Maize Starch Content, and Water Activity. Journal of Food Science, 51(2), 456–459.
- Combrinck, J., Otto, A., & Plessis, J. (2014). Whey Protein / Polysaccharide-Stabilized Emulsions : Effect of Polymer Type and pH on Release and Topical Delivery of Salicylic Acid, 15(3), 588–600. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0081-3>
- Das, K., Ray, D., Bandyopahyay, N. R., Gupta, A., Sengupta, S., Sahoo, S., ... Misra, M.

- (2010). Preparation and Characterization of Cross-Linked Starch/Poly(vinylalcohol) Green Films with Low Moisture Absorption. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(5), 1520–5045.
- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2014). Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural Product Research*, 28(22), 1952–1963. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.918121>
- De Graaf, E. M., Madeka, H., Cocero, a. M., & Kokini, J. L. (1993). Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential scanning calorimetry. *Biotechnology Progress*, 9(2), 210–213. <https://doi.org/10.1021/bp00020a015>
- De Kruif, C. G., & Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15(4–6), 555–563. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00076-5)
- Diab, D. L., Yerian, L., Schauer, P., Kashyap, S. R., Lopez, R., Hazen, L., & Feldstein, A. E. (2009). NIH Public Access, 6(11), 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.07.016> Cytokeratin
- Ergun, R., Lietha, R., & Hartel, R. W. (2010). Moisture and shelf life in sugar confections. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(2), 162–192. <https://doi.org/10.1080/10408390802248833>
- Ergun, R., Lietha, R., Hartel, R. W., Ergun, R., Lietha, R., & Hartel, R. W. (2017). Moisture and Shelf Life in Sugar Confections Moisture and Shelf Life in Sugar, 8398(August). <https://doi.org/10.1080/10408390802248833>
- Fayle, S. E., Healy, J. P., Brown, P. a, Reid, E. a, Gerrard, J. a, & Ames, J. M. (2001). Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins. *Electrophoresis*, 22(8), 1518–1525. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200105\)22:8<1518::AID-ELPS1518>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:8<1518::AID-ELPS1518>3.0.CO;2-U)
- Gregg, R. D., Righetti, L., Buchli, J., & Schaal, S. (2010). Constrained accelerations for controlled geometric reduction: Sagittal-plane decoupling for bipedal locomotion. *2010 10th IEEE-RAS International Conference on Humanoid Robots, Humanoids 2010*,

85(5), 1–7. <https://doi.org/10.1109/ICHR.2010.5686322>

- Grunin, L., Oztop, M. H., Guner, S., & Baltaci, S. F. (2019). Exploring the crystallinity of different powder sugars through solid echo and magic sandwich echo sequences. *Magnetic Resonance in Chemistry*, (March), 1–9. <https://doi.org/10.1002/mrc.4866>
- Hefnawy, H. T. M., & Ramadan, M. F. (2011). Physicochemical characteristics of soy protein isolate and fenugreek gum dispersed systems. *Journal of Food Science and Technology*, 48(3), 371–377. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0203-1>
- Hide, G. A., & Horrocks, J. K. (1994). Influence of stem canker (*Rhizoctonia solani* Kühn) on tuber yield, tuber size, reducing sugars and crisp colour in cv. Record. *Potato Research*, 37(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF02360431>
- Hua, Y., Cui, S. W., & Wang, Q. (2003). Gelling property of soy protein-gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 17(6), 889–894. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00110-3)
- Ikeda, S., Furuta, C., Fujita, Y., & Gohtani, S. (2014). Effects of D-psicose on gelatinization and retrogradation of rice flour. *Starch - Stärke*, 66(9–10), 773–779. <https://doi.org/10.1002/star.201300259>
- Ibanoglu, E., & Erçelebi, E. A. (2007). Thermal denaturation and functional properties of egg proteins in the presence of hydrocolloid gums. *Food Chemistry*, 101(2), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.056>
- Ikeda, S., Gohtani, S., Fukada, K., & Amo, Y. (2011). Dielectric Relaxation and Water Activity in Aqueous Solution of D-Psicose, 12(2), 67–74.
- Jaramillo, D. P., Roberts, R. F., & Coupland, J. N. (2011). Effect of pH on the properties of soy protein-pectin complexes. *Food Research International*, 44(4), 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.057>
- Jideani, V. A. (2012). Functional Properties of Soybean Food Ingredients in Food Systems. In *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology* (pp. 345–366). <https://doi.org/10.5772/14668>
- Kirtil, E., & Oztop, M. H. (2016). H Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry and Magnetic

- Resonance Imaging and Applications in Food Science and Processing. Food Engineering Reviews, 1–22. <http://doi.org/10.1007/s12393-015-9118-y>
- Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Van Camp, J., & Capanoglu, E. (2015). Colour retention, anthocyanin stability and antioxidant capacity in black carrot (*Daucus carota*) jams and marmalades: Effect of processing, storage conditions and in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.021>
- Lam, M., Shen, R., Paulsen, P., & Corredig, M. (2007). Pectin stabilization of soy protein isolates at low pH. *Food Research International*, 40(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.08.004>
- Leinen, K. M., & Labuza, T. P. (2006). Crystallization inhibition of an amorphous sucrose system using raffinose. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(2), 85–89. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.b0085>
- Mariette, F. (2010). Investigations of food colloids by NMR and MRI To cite this version : HAL Id : hal-00455334, 14(3). <https://doi.org/10.106/j.cocis.2008.10.006>
- Matsuo, T., Tanaka, T., Hashiguchi, M., Izumori, K., & Suzuki, H. (2003). Metabolic effects of D-psicose in rats: Studies on faecal and urinary excretion and caecal fermentation. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12(2), 225–231.
- Maugeri, L., Busch, S., McLain, S. E., Pardo, L. C., Bruni, F., & Ricci, M. A. (2017). Structure-activity relationships in carbohydrates revealed by their hydration. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1861(6), 1486–1493. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.017>
- Mccleary, B. V., & Mcgeough, P. (2015). A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo -1 , 4- β -Xylanase, 1152–1163. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1803-z>
- Mennah-Govela, Y. A., & Bornhorst, G. M. (2017). Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During In Vitro Digestion as Influenced by Orange Variety and Processing Method. *Journal of Food Science*, 82(10), 2438–2447. <https://doi.org/10.1111/1750->

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nagaraj, P., Sasidharan, A., David, V., & Sambandam, A. (2017). Effect of cross-linking on the performances of starch-based biopolymer as gel electrolyte for dye-sensitized solar cell applications. *Polymers*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/polym9120667>
- O'Charoen, S., Hayakawa, S., & Ogawa, M. (2015). Food properties of egg white protein modified by rare ketohexoses through Maillard reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 194–202. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12607>
- Özcan, A. (2008). KAĞIT YÜZEY PÜRÜZLÜLÜĞÜNÜN $L^*a^*b^*$ DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(14), 53–61.
- Ozel, B., Uguz, S. S., Kilercioglu, M., Grunin, L., & Oztop, M. H. (2017). Effect of different polysaccharides on swelling of composite whey protein hydrogels: A low field (LF) NMR relaxometry study. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12465>
- Palmer, K. J., Dye, W. B., & Black, D. (1956). X-ray diffractometer and microscopic investigation of crystallization of amorphous sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4(1), 77–81. <https://doi.org/10.1021/jf60059a011>
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Pekal, A., & Pyrzynska, K. (2015). Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(1), 58–62. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.959899>
- Piazza, L., Dürr-Auster, N., Gigli, J., Windhab, E. J., & Fischer, P. (2009). Interfacial rheology

- of soy proteins - High methoxyl pectin films. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2125–2131. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.05.012>
- Pocan, P., Ilhan, E., & Oztop, M. H. (2019). Effect of D-Psicose Substitution on Gelatin Based Soft Candies: A TD-NMR Study. *Magnetic Resonance in Chemistry*, (October 2018), 1–13. <https://doi.org/10.1002/mrc.4847>
- Rivers, D. B., Gracheck, S. J., Woodford, L. C., & Emert, G. H. (1983). Sugars from Saccharified Lignocellulosics, (Table 11), 11–13.
- Sessler, T., Weiss, J., & Vodovotz, Y. (2013). Influence of pH and soy protein isolate addition on the physicochemical properties of functional grape pectin confections. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.013>
- Shao, Y.-Y., & Kao, Y.-J. (2014). Foaming Properties of Soy Protein Isolates and Concentrates. In 2014 International Conference on Food Security and Nutrition (Vol. 67, pp. 56–59). <https://doi.org/10.7763/IPCBE>
- Sun, Y., Hayakawa, S., & Izumori, K. (2004). Antioxidative Activity and Gelling Rheological Properties of Dried Egg White Glycated with a Rare Keto- hexose through the Maillard Reaction. *Journal of Food Science*, 69(6), C427-434.
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M., Fukada, K., & Izumori, K. (2008). Influence of a rare sugar, D-Psikoz, on the physicochemical and functional properties of an aerated food system containing egg albumen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4789–4796. <https://doi.org/10.1021/jf800050d>
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M., & Izumori, K. (2005). Evaluation of the site specific protein glycation and antioxidant capacity of rare sugar-protein/peptide conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10205–10212. <https://doi.org/10.1021/jf051565n>
- Sun, Y., Hayakawa, S., Ogawa, M., & Izumori, K. (2007). Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-Psikoz. *Food Control*, 18(3), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.019>
- Sun, Y., Hayakawa, S., Puangmanee, S., & Izumori, K. (2006). Chemical properties and

antioxidative activity of glycated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction. *Food Chemistry*, 95(3), 509–517.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.033>

Tessier, F. J. (2010). La réaction de Maillard dans le corps humain. Découvertes majeures et facteurs qui affectent la glycation. *Pathologie Biologie*, 58(3), 214–219.
<https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.014>

Veliyulin, E., Mastikhin, I. V., Marble, A. E., & Balcom, B. J. (2008). Rapid determination of the fat content, 2567(August), 2563–2567. <https://doi.org/10.1002/jsfa>

Waterborg, J. H. (2002). The Lowry Method for Protein Quantitation. In J. . Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (p. 1146). <http://doi.org/10.1385/1-59259-169-8:7>

Wong, Y. H., Tan, C. P., Long, K., & Nyam, K. L. (2014). In vitro simulated digestion on the biostability of hibiscus cannabinus L. seed extract. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(2), 177–181.

Zhong, C., Tan, S., & Langrish, T. (2019). Redness generation via Maillard reactions of whey protein isolate (WPI) and ascorbic acid (vitamin C) in spray-dried powders. *Journal of Food Engineering*, 244(September 2018), 11–20.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.020>

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. HALİL MECİT ÖZTOP
Proje No:	116O759
Proje Başlığı:	Düşük Rezolüsyonlu NMR Relaksometre ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) Teknikleri Kullanarak D-Psikoz (Nadir Şeker) İçeren Glike Protein ve Şekerleme Ürünleri Tasarımı ve Bu Ürünlerin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	BEKİR GÖKÇEN MAZI, ULVİYE BETÜL SÖYLER, SERVET GÜLÜM ŞÜMNÜ
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. MÜHENDİSLİK F. GIDA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2017 - 15/06/2019
Onaylanan Bütçe:	399400.0
Harcanan Bütçe:	371833.81
Öz:	<p>Nadir şeker, doğada yaygın olarak bulunmayan monosakkaritleri kapsayan şeker grubuna verilen genel addır. Meyve şekeri fruktozun C-3 epimeri olan ve nadir bir şeker olan D-Psikozun (alluloz) tatlılığı sakarozun %70'ine denk gelmektedir. Kalori değeri ise 0.39 kCal/g olan D-Psikozun, vücutta yağ toplanmasını ve kandaki glikoz seviyesini azaltmada etkisi olduğu ve ısıtma işlemi sonucunda oluşturduğu bileşenlerin antioksidatif etki gösterdiği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. A.B.D Gıda ve İlaç Komisyonu, 2012 yılında D-Psikozu GRAS (Güvenli olarak kabul edilebilir) statüsüne aldıktan sonra bu şekerin sakaroz yerine kullanımının önü açılmış olmuştur. D-Psikozun emilim metabolizması, sağlık üzerindeki etkileri ve gıdalarda kullanımı ile ilgili araştırmalar Kagawa Üniversitesinde hala devam etmektedir. D-Psikozun gıdalarda kullanımı ile ilgili Türkiye'de henüz herhangi bir araştırma yapılmadığı bilinmektedir. European Network on NMR Relaxometry COST aksiyonu çağrısı altında önerilen bu projede, D-Psikoz ile formüle edilen farklı şekerleme ürünlerinin tasarlanması ve bu ürünlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Bahsi geçen COST Aksiyonu NMR Relaksometre'nin gıda kalitesi araştırmalarında kullanımını da kapsamaktadır. Proje kapsamında D-Psikoz kullanarak 2 farklı ürün tasarlanacak ve bu ürünlerin farklı özellikleri incelenecektir. Proje kapsamında, soya proteini ve nişasta/pektin içeren jel yapıda yumuşak şekerlemeler ve D-Psikozla glike olmuş soya proteini üretilenektir. Piyasada var olan şekerleme ürünlerinin çoğunun jelatin tabanlı olduğu düşünüldüğünde soya proteini ile yapılacak bir şekerlemenin sektöre katma değeri olabileceği açıktır. Özellikle jelatinli ürün tüketmeyi tercih etmeyen kesim düşünüldüğünde (vejetaryenler, veganlar) bu ürün şekerleme sektörü için bir yenilik sayılabilecektir. Soya proteini, nişasta ve pektin içeren şekerleme ürünlerine dair çalışmalar literatürde mevcuttur. Proje kapsamında geliştirilecek ürünün, D-Psikoz içerecek olması, şekerlemelerin hem D-Psikozla glike olmuş hem de olmamış soya proteini ile hazırlanacak olması projenin yenilikçi yönünü artırmakla beraber projeye özgünlük kazandırmaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler:	Nadir Şeker, D-Şekerleme, Glikasyon, Soya Proteini, NMR Relaksometre
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır